

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

**Ανάπτυξη μεθοδολογίας HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της
βιταμίνης D στο πλάσμα**

ΠΑΛΑΙΟΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Περιεχόμενα

1	Βιταμίνη D: Νέοι ρόλοι του παράγοντα υγείας του ανθρώπου	5
1.1	Εισαγωγή	5
1.1.1	Ανακάλυψη της βιταμίνης D, διαλεύκανση της δομής και του τρόπου παραγωγής της στους ζωντανούς οργανισμούς	5
1.1.2	Οι δύο σημαντικότερες χημικές μορφές της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό και η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη	7
1.2	Βιοχημικοί μηχανισμοί και μονοπάτια σύνθεσης, μεταβολισμού και δράσης της βιταμίνης D	9
1.2.1	Μεταβολισμός της βιταμίνης D ως μονοπάτι ενεργοποίησης της ορμονικής της δράσης	9
1.2.2	Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D	11
1.3	Αναγνωρισμένοι ρόλοι της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό	12
1.3.1	Νέοι ρόλοι της βιταμίνης D που έχουν ανακαλυφθεί στην υγεία του ανθρώπου	14
1.4	Εκτίμηση επάρκειας βιταμίνης D για διαγνωστικούς σκοπούς	21
1.4.1	Καταλληλότερος μεταβολίτης για την εκτίμηση επάρκειας	21
1.4.2	Κατηγορίες επιπέδων βιταμίνης D	22
1.4.3	Κλινικό ενδιαφέρον για επάρκεια σε βιταμίνη D	23
1.4.4	Βιταμίνη D, ένας δύσκολος αναλύτης	25
1.5	Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση και αξιολόγηση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό	26
1.5.1	Δοκιμές ανταγωνιστικής δέσμησης (Competitive binding assays)	26
1.5.2	Χρωματογραφικές τεχνικές	29
1.5.3	Συσχέτιση των τεχνικών / Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα	30
1.6	Επικύρωση μεθόδων	34
1.6.1	Επικύρωση μεθόδων	34
1.6.2	Βελτιστοποίηση (Optimization)	35
1.6.3	Όροι και ορισμοί	36
2	Υλικά και μέθοδοι	42
2.1	Υλικά και αναλώσιμα	42
2.2	Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου	42
2.3	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και εκχύλιση των 25-OH D3/D2	43
2.4	Σύστημα HPLC και On-line SPE	44
2.4.1	Σύστημα HPLC	44
2.4.2	On-line SPE	45
3	Ανάπτυξη μεθόδου	49
3.1	Βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης για την εύρεση της αποδοτικότερης μεταφοράς των αναλυτών από την SPE στήλη στην αναλυτική στήλη	49
3.2	Πείραμα διαφυγής (breakthrough) με αύξηση του όγκου έγχυσης από 100-500μl με συγκέντρωση 100ng/ml	49
3.3	Επίδραση ενδογενών ουσιών του πλάσματος στην απόκριση του οργάνου	51
3.4	Αποδοτικότητα εκχύλισης των αναλυτών από τη μήτρα του πλάσματος μέσω της διαδικασίας κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και απομόνωσης των αναλυτών από τη συνδέουσα πρωτεΐνη	52
3.5	Εκτίμηση απόδοσης της on-line SPE	53

4	Εκτίμηση απόδοσης της μεθόδου	55
4.1	Γραμμικότητα της μεθόδου.....	55
4.2	Ειδικότητα, όριο ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού.....	55
4.3	Ορθότητα και ακρίβεια της μεθόδου	56
	Πίνακας 12. Ορθότητα και ακρίβεια μεθόδου.....	57
4.4	Επιδοκιμασία της μεθόδου που αναπτύχθηκε.....	57
5	Συζήτηση	59
6	Βιβλιογραφία	61

Συντομογραφίες

RXR - retinoid X receptor
PTH - Parathyroid hormone
VDREs - Vitamin-D Response Elements
VDR – Vitamin D Receptor
Hr - Hairless
VDBP- Vitamin D Binding Protein
nls - nuclear localization signal
FGF - fibroblast growth factor
Phex - Phosphate-regulating neutral endopeptidase, X-linked
IU – International Units (1IU - 0.025 µg Vitamin D3 & D2)
RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RANK - Receptor activator of NF-κB
Lrp5 - Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
RUNX2 - Runt-related transcription factor 2
TRPV6 - transient receptor potential
BAX - Apoptosis regulator BAX ή bcl-2-like protein 4
BCL2 - B-cell lymphoma 2
cAMP - Cyclic adenosine monophosphate
CBP / p300 - CREB-binding protein / E1A binding protein p300
CCND1 - G1/S-specific cyclin-D1
CCND3 - G1/S-specific cyclin-D3
CCNA1 - Cyclin-A1
CCNE1 - Cyclin-E1
CDKN1A - cyclin-dependent kinase inhibitor 1 ή CDK-interacting protein 1 (p21)
CDKN1B - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)
EKK - extracellular-signal-regulated kinase
GDNF – Glial cell-derived neurotrophic factor
MAPK - Mitogen-activated protein kinase
M-CSF - macrophage colony-stimulating factor
MEK – MAP kinase kinase
PKA – Protein kinase A
PKC – Protein kinase C
pRb – retinoblastoma protein
Raf – serine/threonine-specific protein kinase (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
Ras – small GTPase ('Rat sarcoma')
TF2B or TFIIB – Transcription factor IIB
TLR – Toll-like receptors
TNF-a – Tumor necrosis factor -a

1 Βιταμίνη D:Νέοι ρόλοι του παράγοντα υγείας του ανθρώπου

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Ανακάλυψη της βιταμίνης D, διαλεύκανση της δομής και του τρόπου παραγωγής της στους ζωντανούς οργανισμούς

Η βιταμίνη D άργησε αρκετά να ανακαλυφθεί και να μελετηθεί σε σχέση με την εποχή που αρχίσανε να μελετούνται οι παθολογικές συνέπειες της έλλειψης της. Η κυριότερη επίπτωση στον ανθρώπινο οργανισμό και η πιο εμφανής είναι η ραχίτιδα, μια παιδική νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην ανάπτυξη των οστών με ειδικές παραμορφώσεις στη σπονδυλική στήλη και σε άλλα μέρη του σκελετού (Εικόνα 1) (1)(Wolf, 2004). Για την αντιμετώπισή της χρησιμοποιούνταν το μωρουνέλαιο (2)(McCollum, 1957).



Εικόνα 1. Χαρακτηριστική εικόνα της ραχίτιδας με παραμόρφωση των κάτω άκρων σε παιδιά που έχει προκληθεί από έλλειψη βιταμίνης D.

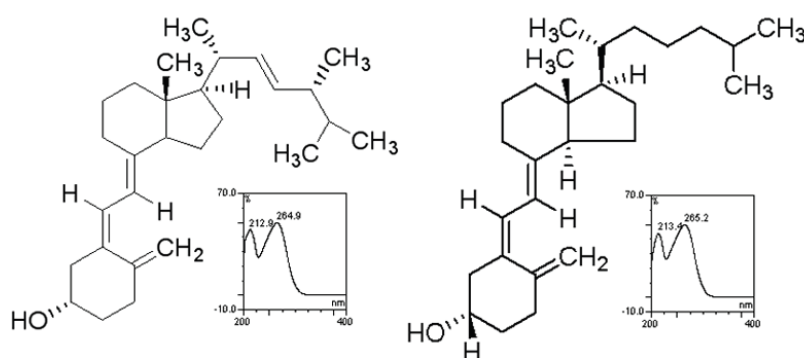
Ο Mellanby το 1919 απέδειξε ότι η διατροφή με χαμηλά λιπαρά προκαλεί ραχίτιδα σε πειραματόζωα για αυτό, κατέληξαν ότι η ραχίτιδα είναι μία ασθένεια που είναι αποτέλεσμα έλλειψης ενός λιποδιαλυτού παράγοντα διατροφής (3)(Mellanby, 1919). Ακολούθησε μια σειρά σπουδαίων πειραμάτων, με πιο σημαντικό αυτό του McCollum το 1922 στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μωρουνέλαιο, όπου η δράση γνωστών λιποδιαλυτών παραγόντων, όπως η βιταμίνη Α είχε καταστραφεί. Παρόλα

αυτά το μωρουνέλαιο μπορούσε ακόμη να θεραπεύσει την ραχίτιδα. Γι' αυτό, λοιπόν, συμπεράναν ότι και μία άλλη ένωση παίζει ρόλο στην υγεία των οστών και η ένωση αυτή ονομάστηκε βιταμίνη D (4)(McCullum et al, 1922). Ενδιάμεσα στις παραπάνω ανακαλύψεις και έρευνες εμφανίστηκε μία καινούρια θεραπεία για την ραχίτιδα, η ηλιοθεραπεία. Το 1921 οι Hess και Unger εξήγησαν ότι η εποχιακή έξαρση της ραχίτιδας συνδέεται σημαντικά με τις εποχιακές μεταβολές της ηλιοφάνειας (5)(Hess & Unger, 1921). Η παραπάνω παρατήρηση όπως και η απόδειξη από τον Huldschinsky το 1919 ότι λάμπες υπεριώδους φωτός μπορούν να θεραπεύσουν την ραχίτιδα, οδήγησαν σε νέα πειράματα (6)(Huldschinsky, 1919). Η θεραπεία από την έκθεση στο υπεριώδες φως άρχισε να αποσαφηνίζεται το 1924 από τρία διαφορετικά εργαστήρια, όπου το 1925 ο Hess οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι η πρόδρομη ένωση που ενεργοποιείται μετά από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, ήταν η χοληστερόλη. Ο Hess στο πείραμα του χρησιμοποίησε ως καθαρή πηγή χοληστερόλης εγκέφαλο από επίμυ. Το δείγμα αυτό το εξέθεσε στην υπεριώδη ακτινοβολία και το παρείχε ως τροφή σε άλλους επίμυες που δεν εκτίθονταν σε υπεριώδη ακτινοβολία και στερούνταν άλλης τροφής πλούσια σε βιταμίνη D. Οι επίμυες δεν ανέπτυξαν ραχίτιδα και έτσι οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι η χοληστερόλη είναι η πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D (7)(Hess et al., 1925). Όμως, το 1926 ο Heilbron και οι συνεργάτες του παρατήρησαν πως στο δείγμα που θεωρούσε καθαρό ως προς την χοληστερόλη ο Hess περιέχονταν και μια άλλη ένωση η οποία μπορεί να είναι η πρόδρομος ένωση για την βιταμίνη D (8)(Heilbron, 1927). Μετά από αυτή την εξακρίβωση ο Hess συνεργάστηκε με τον Rosenheim και το διάσημο Adolf Windaus για περαιτέρω έρευνα (9)(Windaus & Hess, 1926). Το 1926 η ομάδα του Rosenheim επιβεβαίωσε ότι η χοληστερόλη δεν ήταν η πρόδρομη ένωση για την βιταμίνη D, αλλά κάποια άλλη ένωση που περιείχε το δείγμα του Hess ήταν η πρόδρομη ένωση (10)(Rosenheim & Webster, 1926). Επίσης, από αναλύσεις γνώριζαν ότι η ζητούμενη ένωση είχε ιδιότητες ενός στεροειδούς, εμπεριείχε τρεις διπλούς δεσμούς και βρισκόταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο Windaus και ο Hess δοκίμασαν αρκετά διαφορετικά στεροειδή φυτικής προέλευσης, καταλήγοντας στην εργοστερόλη (11)(Windaus & Hess, 1926). Το 1931 οι Askew, Reerink και Windaus απομονώσανε και κρυσταλλώσανε το παράγωγο της εργοστερόλης, το οποίο ονομάστηκε βιταμίνη D₂ ή καλσιφερόλη (12)(Askew et al., 1931), (13)(Reerink, 1931), (14)(Windaus, 1931).

Όμως μετά από την ανακάλυψη και χαρακτηρισμό της βιταμίνης D₂ παρέμενε ακόμη το ερώτημα ποιο ήταν το αντίστοιχο δραστικό παράγωγο της εργοστερόλης στους ζωικούς οργανισμούς, καθώς η εργοστερόλη μπορεί να παραχθεί μόνο σε φυτικούς οργανισμούς. Το ερώτημα λύθηκε αργότερα από τους Windaus και Bock το 1937 όταν απομόνωσαν την 7-δεϋδροχοληστερόλη από δέρμα χοίρου και μετέπειτα σε δέρμα επίμου και ανθρώπου, όπως και σε τροφές ζωικής προέλευσης. Το προϊόν που προκύπτει μετά από έκθεση της 7-δεϋδροχοληστερόλης στην υπεριώδη ακτινοβολία ονομάστηκε βιταμίνη D₃ ή χοληκαλσιφερόλη (15)(Windaus & Bock, 1937)

1.1.2 Οι δύο σημαντικότερες χημικές μορφές της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό και η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη

Η βιταμίνη D αν και ονομάστηκε βιταμίνη όταν ανακαλύφθηκε, είναι μία προορμόνη, που συντίθεται σε επαρκείς ποσότητες στον ανθρώπινο οργανισμό ακολουθώντας ένα ελεγχόμενο μονοπάτι μεταβολισμού, στο οποίο συμμετέχουν κυρίως το δέρμα, το ήπαρ και οι νεφροί με τελική παραγωγή των διυδροξυλιωμένων προϊόντων που ασκούν την ορμονική τους δράση. Μόνο ένα μικρό σχετικά ποσοστό (<20%) προσλαμβάνεται αποκλειστικά από τη διατροφή. Ο τρόπος με τον οποίο δρα, η δομή της, καθώς και η πρόδρομη ένωση από την οποία συντίθεται την κατατάσσουν στις στεροειδείς ορμόνες. Η βιταμίνη D ανήκει σε μία μεγάλη ομάδα λιποδιαλυτών σεκοστεροειδών (τύπος στεροειδούς με σπασμένο τον β-δακτύλιο) και στον ανθρώπινο οργανισμό οι δυο σημαντικότερες χημικές μορφές που συναντώνται είναι η βιταμίνη D₂ ή εργοκαλσιφερόλη και η βιταμίνη D₃ ή χοληκαλσιφερόλη (Εικόνα 2). Οι δύο παραπάνω χημικές μορφές παρουσιάζουν δομική διαφορά στην πλάγια αλειφατική αλυσίδα. Στη βιταμίνη D₂ είναι διακλαδισμένη και ακόρεστη, ενώ στην βιταμίνη D₃ είναι λιγότερο διακλαδισμένη και κορεσμένη. Παρά την δομική διαφορά και οι δύο μορφές εμφανίζουν παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες και έχουν το ίδιο φάσμα απορρόφησης UV-Vis με μέγιστη απορρόφηση στα 265nm (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Δομή και φάσμα απορρόφησης των βιταμινών D3(χοληκαλσιφερόλη) και D2(εργοκαλσιφερόλη).

Στον ανθρώπινο οργανισμό συντίθεται μόνο η βιταμίνη D3, ενώ μέσω της διαίτας μπορούν να προσληφθούν και οι δύο μορφές, με τη βιταμίνη D2 να είναι μόνο φυτικής προέλευσης (πχ. μανιτάρια) και τη βιταμίνη D3 να είναι ζωικής προέλευσης. Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S.F.D.A.) προτείνει ως ημερήσια συνιστώμενη πρόσληψη τα 400IU (Πίνακας 1).

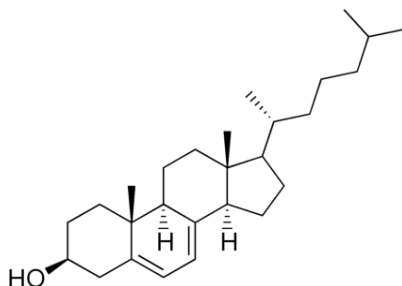
Ηλικία	Ανδρας	Γυναίκα		Εγκυμοσύνη	Θηλασμός
0–12 μηνών	400 IU (10 mcg)	400 IU (10 mcg)			
1–13 ετών	600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)			
14–18 ετών	600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)		600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)
19–50 ετών	600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)		600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)
51–70 ετών	600 IU (15 mcg)	600 IU (15 mcg)			
>70 ετών	800 IU (20 mcg)	800 IU (20 mcg)			

Πίνακας 1. Ημερήσια συνιστώμενη πρόσληψη (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010.)

1.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί και μονοπάτια σύνθεσης, μεταβολισμού και δράσης της βιταμίνης D

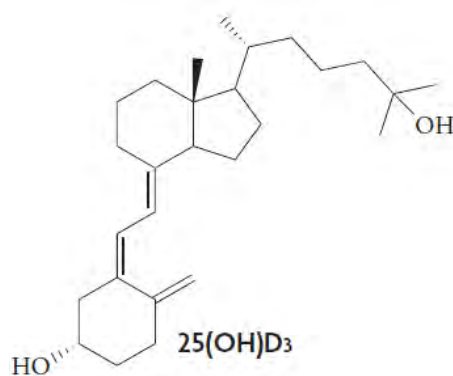
1.2.1 Μεταβολισμός της βιταμίνης D ως μονοπάτι ενεργοποίησης της ορμονικής της δράσης

Η βιταμίνη D₃ συντίθεται στο εξωτερικό στρώμα του δέρματος, την επιδερμίδα και συγκεκριμένα στην κεράτινη και στην ακανθώδη στοιβάδα, από την έκθεση μιας στερόλης, της 7-δεϋδροχοληστερόλης (Εικόνα 3), στην υπεριώδη ακτινοβολία του ηλιακού φωτός, από τα 270nm μέχρι 300nm, με τη μέγιστη απόδοση σε μήκη κύματος από 295nm έως 297nm (16) (Deer, 2007).



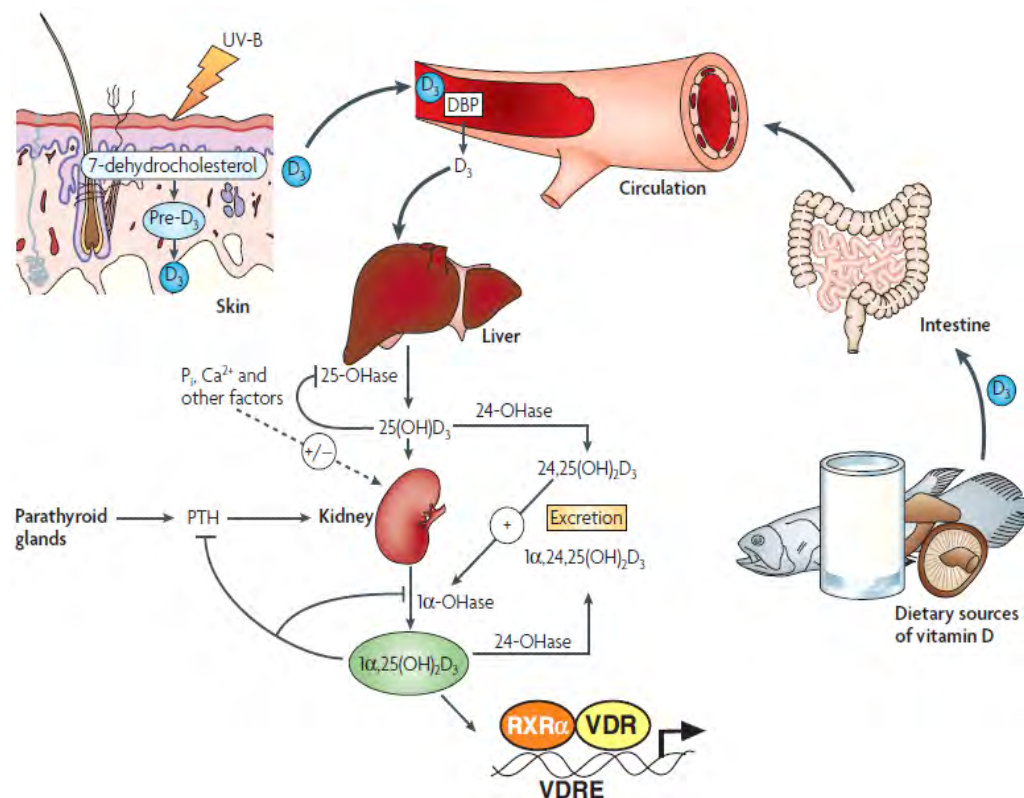
Εικόνα 3. 7-δεϋδροχοληστερόλη

Η φωτοχημική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του β-δακτυλίου στην 7- δεϋδροχοληστερόλη παράγοντας τη προβιταμίνη D₃ (16) (Deer, 2007). Ακολούθως, ισομερίζεται αυθόρμητα και προκύπτει η χοληκαλσιφερόλη. Η χοληκαλσιφερόλη όπως και η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) μέσω της κυκλοφορίας του αίματος οδηγούνται στο ήπαρ, όπου οι δύο χημικές μορφές υδροξυλιώνονται στην πλάγια αλειφατική αλυσίδα από δύο ένζυμα της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450 παράγοντας την 25-OH D₃ και 25-OH D₂(Εικόνα 4).

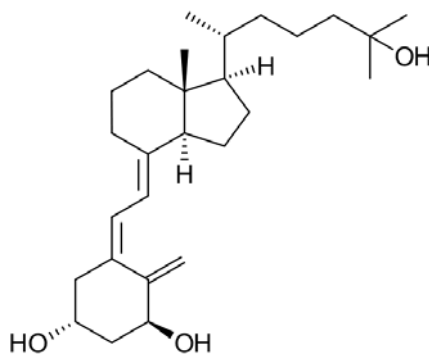


Εικόνα 4. 25-OH D3

Στη συνέχεια μεταφέρονται στους νεφρούς όπου καθορίζεται εάν θα μετατραπούν στην ενεργή ή ανενεργή μορφή της βιταμίνης D. Η σύνθεση της βιταμίνης D ελέγχεται κυρίως στους νεφρούς κατά τη μετατροπή της 25-OH D3 και 25-OH D2 προς την ενεργή και ανενεργή της μορφή (Εικόνα 5). Οι ενεργές μορφές των 25-OH D3 και 25-OH D2 είναι οι 1,25-(OH)₂ D3 και 1,25-(OH)₂ D2 οι οποίες έχουν ορμονική δράση και οι μορφές αυτές θα οδηγηθούν στα κύτταρα στόχους (Εικόνα 6) (17) (Brenza, 2000). Οι ανενεργές μορφές είναι οι 24,25-(OH)₂ D3 και 24,25-(OH)₂ D2 και οδηγούνται προς αποικοδόμηση.



Εικόνα 5. Ελεγχόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι (16) (Deeb et al, 2007)



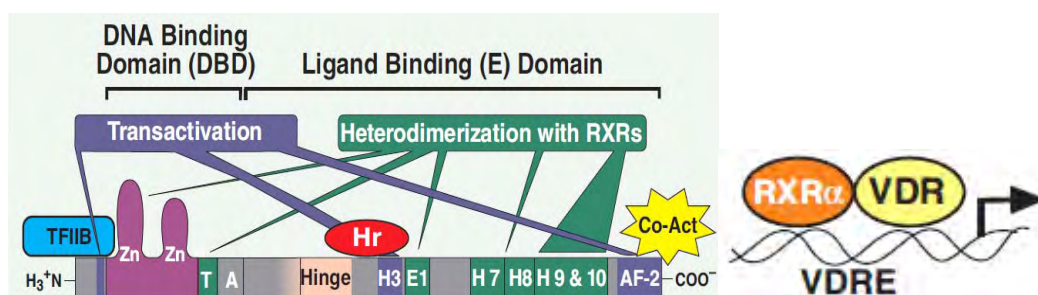
Εικόνα 6. 1,25-(OH)₂ D₃

Η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της είναι έντονα υδρόφοβες ουσίες και για τη μεταφορά τους στην κυκλοφορία του αίματος από τη θέση σύνθεσης στα όργανα στόχους συνδέονται με μια μεταφορική πρωτεΐνη που εξασφαλίζει τη διαλυτότητά τους στο υδάτινο περιβάλλον του αίματος. Η μεταφορική πρωτεΐνη της βιταμίνης D ονομάζεται βιταμίνη D συνδέουσα πρωτεΐνη(VDBP). Η VDBP είναι μία γλυκοπρωτεΐνη γνωστή και ως gc-σφαιρίνη μοριακού βάρους περίπου 58 kDa, αποτελούμενη από 458 αμινοξέα. Η VDBP εντοπίζεται στο πλάσμα, ασκитικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στην επιφάνεια πολλών τύπων κυττάρων (18) (*Haussler et al, 2008*), (19) (*Verboven, 2002*).

1.2.2 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D

Μετά τη σύνθεση της ενεργούς μορφής της βιταμίνης D και της μεταφοράς της στα κύτταρα στόχους η 1,25(OH)₂D₃/D₂ προσδένεται στον λεγόμενο υποδοχέα της βιταμίνης D - VDR (Vitamin D Receptor). Ο VDR είναι πυρηνικός υποδοχέας που εμφανίζει αρκετές ομοιότητες και είναι μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων της θυροειδούς ορμόνης και των στεροειδών. Όταν ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη του ετεροδιμερίζεται, με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RXR). Το ετεροδιμερές συνδέεται σε συγγενείς αλληλουχίες στόχους του DNA ή αλλιώς στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDREs), δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής και με ιστοειδικούς συνενεργοποιητές. Συνήθως, προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου που ρυθμίζει.

Ο VDR είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 427 αμινοξέα και έχει δύο μεγάλες λειτουργικές υπομονάδες, που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο και στο καρβοξυτελικό άκρο, εμφανίζοντας αλληλεπιδράσεις με το ετεροδιμερές του και διάφορους άλλους συνενεργοποιητές. Το αμινοτελικό άκρο συνδέεται στο DNA με δάκτυλα ψευδαργύρου, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο έχει την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη. Το γονίδιο του VDR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q αποτελούμενο από υποκινητή, ρυθμιστικές περιοχές και 8 εξόνια, ένα από τα οποία κωδικοποιεί το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nls) (Εικόνα 7). Ο VDR είναι από τα περισσότερο αρχαία εξελικτικά μέλη της οικογένειας των 48 πυρηνικών υποδοχέων που έχουν αποκωδικοποιηθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα (18) (Haussler et al, 2008).



Εικόνα 7. Λειτουργικές περιοχές και δομή υποδοχέα βιταμίνης D. Λειτουργικές περιοχές του ανθρώπινου VDR σε αντιστοιχία με την πρόσδεση του με το DNA και πρωτεϊνικούς προσδέτες. Αριστερά εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης με το DNA, η οποία αλληλεπιδρά μέσω δακτύλων ψευδαργύρου με τον RXR, μεσολαβώντας έτσι στην άμεση αλληλεπίδραση με τα γονίδια στόχους, όπου και εμφανίζει τις βιολογικές της δράσεις. Η περιοχή E1 είναι από τους πιο υψηλά συντηρημένους πυρηνικούς υποδοχείς και απαρτίζεται από τις έλικες 4 και 5.

1.3 Αναγνωρισμένοι ρόλοι της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό

Η κυρίαρχη δράση της 1,25-(OH)₂D αφορά την ομοιόσταση του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό. Συνεπώς, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D οδηγεί σε ανωμαλίες, τόσο στην ομοιόσταση του ασβεστίου, όσο και στο μεταβολισμό του φωσφόρου. Για να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα της εντερικής βιταμίνης

D-εξαρτώμενης μεταφοράς ασβεστίου, οι συγκεντρώσεις, στον ορό, της 25-OH D3 πρέπει να είναι τουλάχιστον 78nmol/L (30ng/mL).

Όταν υπάρχει ανεπάρκεια ασβεστίου, η 1,25-(OH)₂D3 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της στους οστεοβλάστες και επάγει την έκφραση του ενεργοποιητή του υποδοχέα NF-κΒ, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα στους προοστεοκλάστες, διαμορφώνοντας τους σε ώριμους οστεοκλάστες. Το άμεσο αποτέλεσμα είναι να ενισχυθεί η κινητοποίηση του ασβεστίου από το σκελετό, για να διατηρηθεί η συγκέντρωση του ασβεστίου του ορού σε φυσιολογικές τιμές. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει ως αποτελέσματα μειωμένα επίπεδα ιονισμένου ασβεστίου, το οποίο αναγνωρίζεται αμέσως από τον αισθητήρα ασβεστίου στους παραθυρεοειδείς αδένες. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη έκφραση, παραγωγή και έκκριση της PTH. Η PTH βοηθά στη διατήρηση των επιπέδων ασβεστίου αυξάνοντας τη σωληνοειδή επαναρρόφηση του ασβεστίου στους νεφρούς, ενισχύοντας την παραγωγή της 1,25-(OH)₂D3, και την αλληλεπίδρασή της με τους οστεοβλάστες για να αυξήσει την έκφραση τον ενεργοποιητή του υποδοχέα του NF-κΒ RANK. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D προκαλεί έτσι, ραχίτιδα και οστεομαλακία τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες, οι οποίοι συνήθως έχουν φυσιολογικά επίπεδα ασβεστίου στον ορό (20) (Michael F Holick et al., 2004). Επίσης, η βιταμίνη D, ελέγχοντας τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό, αλλά και στα οστά, μπορεί να επηρεάσει, όπως είδαμε, την πυκνότητα των οστών, προκαλώντας έτσι οστεοπόρωση. Επίσης, χαμηλά επίπεδα της 25-OH D3 στον ορό, φαίνεται να επάγουν την δημιουργία οστεοαρθρίτιδας, χωρίς όμως να έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το διακυτταρικό μονοπάτι (21) ([Christodoulou S. et al., 2013](#)).

Ταυτόχρονα, κατά την επιδιόρθωση της υποασβεστιαϊμίας η 1,25-(OH)₂D ρυθμίζει τα επίπεδα του φωσφόρου. Αρχικά, το πλεόνασμα φωσφόρου εξαλείφεται από την φωσφατουρική δράση της PTH, αλλά αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να είναι μόνο παροδικό επειδή το ασβέστιο και η 1,25-(OH)₂D αναστέλλουν την PTH, γεγονός που κάνει αναγκαία τη συμμετοχή μιας δεύτερης φωσφατουρικής ορμόνης, η οποία προτείνεται πως είναι ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-23 (FGF23). Ο FGF23 εκκρίνεται κυρίως από τους οστεοβλάστες. Σε επίμυες με μη λειτουργικό FGF23 βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα 1,25-(OH)₂D στον ορό, υπερφωσφαταιμία, υπερμετάλλωση των οστών, εκτοπή οστεοποίηση σε μαλακούς ιστούς και τελικά παρατηρήθηκε θάνατος από καρδιαγγειακή και αναπνευστική ανεπάρκεια (22) (Shimada et al., 2004).

1.3.1 Νέοι ρόλοι της βιταμίνης D που έχουν ανακαλυφθεί στην υγεία του ανθρώπου

Ο υποδοχέας VDR, ο οποίος είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας, όπως και όλοι οι υποδοχείς των στεροϊδών ορμονών δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας, έχοντας ως στόχο περισσότερα από 200 γονίδια. Αυτό το γεγονός, όπως και οι ενδείξεις που έχει η ιατρική κοινότητα τα τελευταία χρόνια για την άμεση σχέση των επιπέδων της βιταμίνης D με την εξέλιξη πολλών παθολογικών καταστάσεων (Εικόνα 8), έχει προκαλέσει μία έντονη ερευνητική δραστηριότητα για αποσαφήνιση των ρόλων και των δράσεων της βιταμίνης D στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Έχουν ήδη υπάρξει αρκετές μελέτες που καταδεικνύουν την έμμεση ευεργετική επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες και προτείνουν ένα φάσμα επιπέδων ολικής 25-OH D (30-70ng/ml) στον ορό ως το ιδανικότερο για την πρόληψη-μείωση εμφάνισης των νόσων που έχουν συσχετιστεί. Έχουν βρεθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα, λόγω και του πρόσφατου ερευνητικού ενδιαφέροντος, φανερώνοντας ότι τα επόμενα χρόνια θα διαλευκανθούν πολλές άγνωστες πτυχές των δράσεων της 1,25-(OH)₂ D₂ και D₃ μαζί με τον VDR. Η 1,25-(OH)₂ D₂ και D₃ εμπλέκεται σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο.

Vitamin D – Percentage Reduction of Disease Incidence at Different Blood Serum Levels

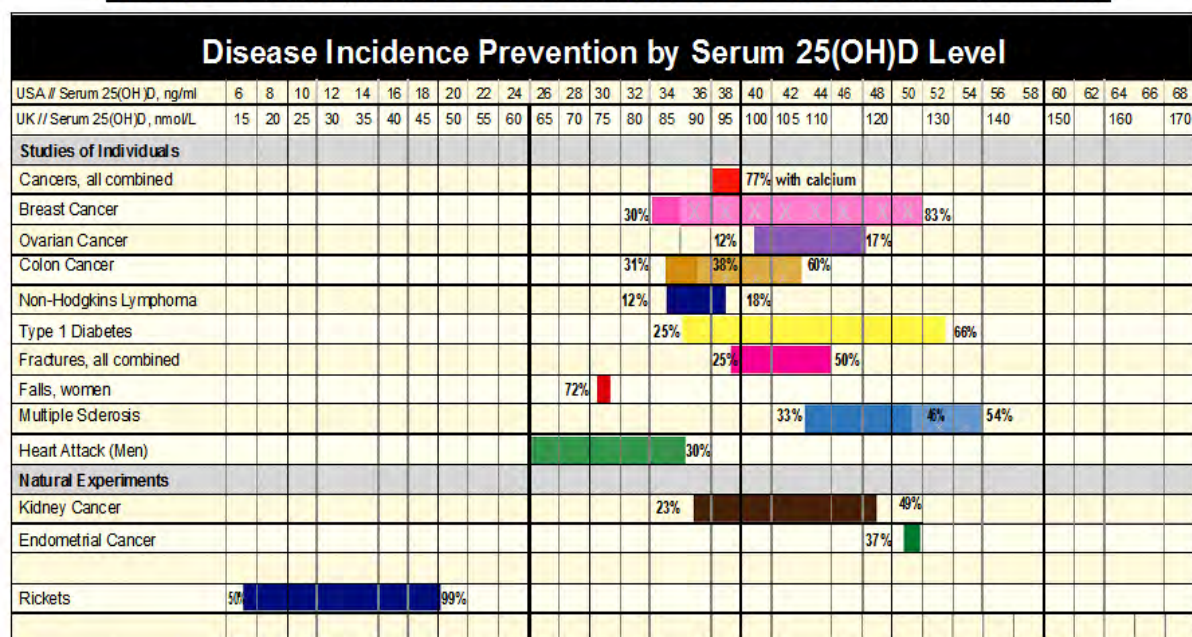


Chart prepared by: Garland CF, Baggerly CA

Εικόνα 8. Πρόληψη επιπτώσεων των ασθενειών σύμφωνα με τα επίπεδα της 25-OH D. (http://www.grassrootshealth.org/download/disease_incidence_prev_chart_10168.pdf)

1.3.1.1 Βιταμίνη D και καρκίνος

Πολλές μελέτες συσχετίζουν τα επίπεδα της βιταμίνης D με διάφορες μορφές καρκίνου καθώς και την αυξημένη παραγωγή της βιταμίνης D με την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου και του καρκίνου του πνεύμονα. Διάφορα πειράματα με knock-out ποντίκια για βασικά μόρια της διακυτταρικής οδού μέσω της βιταμίνης D, απέδειξαν την εμπλοκή της 1,25-(OH)₂D₃ σε διάφορες διαδικασίες όπως η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, η απόπτωση, η αγγειογένεση κ.α. Επίσης, πειράματα και στατιστικές μελέτες υποδεικνύουν ότι στις χώρες, όπου οι άνθρωποι εκτίθενται περισσότερο στον ήλιο, υπάρχει μια προστατευτική επίδραση μεσολαβούμενη από την βιοσύνθεση και την διακυτταρική δράση της βιταμίνης D.

Γενικά, η βιταμίνη D ασκεί την αντικαρκινική της δράση μέσω γονιδιωματικών και μη-γονιδιωματικών δράσεων. Ως προς τη γονιδιωματική της δράση, η 1,25-(OH)₂D₃ μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει την έκφραση διαφόρων γονιδίων μέσω της σύνδεσής της με τον VDR και επικουρικά με την

συνενεργική δράση του υποδοχέα του ρετινοϊκού X (RXR) (23) (Carlberg, C. *et al.*, 1993). Όσον αφορά τη μη-γονιδιωματική οδό, η 1,25-(OH)₂D₃ μπορεί να αλληλεπιδρά με μια πληθώρα μεταγωγικών μονοπατιών, όπως τον καταρράκτη κινασών Raf-MEK-MAPK-EKK, τα μόρια PKC και πολλά άλλα, στα οποία οι άμεσες ή έμμεσες αλληλεπιδράσεις δεν έχουν ταυτοποιηθεί (24) (Morelli, S. *et al.*, 2001).

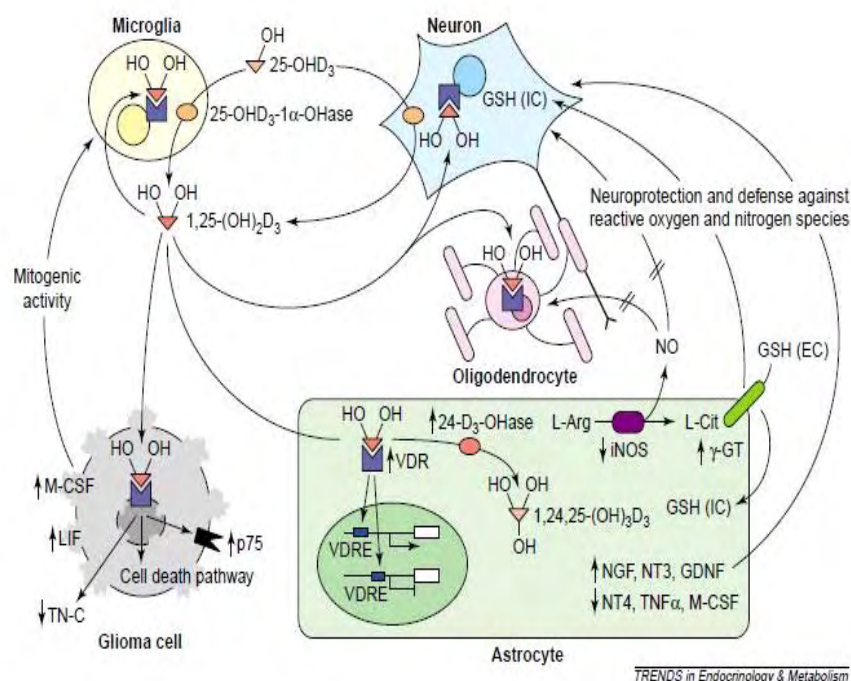
Η αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση της 1,25-(OH)₂D₃ υπαγορεύεται από τη διατάραξη του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα. Έτσι, μεταγραφικοί στόχοι του συμπλόκου 1,25-(OH)₂D₃- VDR αποτελούν γονίδια, τα προϊόντα των οποίων επηρεάζουν την φυσιολογική ροή του κυτταρικού κύκλου σε ανθρώπινα μυελομονοκυτικά κύτταρα U937 (25) (Liu, M *et al.*, 1996). Εκτός όμως από τις αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες της 1,25-(OH)₂D₃ υπάρχουν στοιχεία για την αντικαρκινική δράση της 1,25-(OH)₂D₃ μέσω της απόπτωσης όπως: καταστολή της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, καταστολή πρωτεϊνών προ-επιβίωσης BCL2 και BCL-XL, ή την επαγωγή της έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (όπως BAX, BAK και BAD) (26) (Ylikomi, T. *et al.* 2002).). Εκτός από την ρύθμιση της έκφρασης της οικογένειας BCL2, η 1,25-(OH)₂D₃ θα μπορούσε επίσης άμεσα να ενεργοποιεί μόρια τελεστές κασπασών. Πρόσφατα αποδείχτηκε και η αντικαρκινική αποπτωτική δράση της 1,25-(OH)₂D₃ σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών μέσω της αποσταθεροποίησης της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT) σε επίπεδο mRNA. Βέβαια, αν και η αντικαρκινική δράση της 1,25-(OH)₂D₃ μέσω απόπτωσης είναι τεκμηριωμένη, ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Άλλος ένας αντικαρκινικός μηχανισμός της 1,25-(OH)₂D₃ αποτελεί η μείωση της αγγειογένεσης. Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση 1,25-(OH)₂D₃ σε ποντικούς που φέρουν MCF-7 μπορεί να αναστείλει *in vivo* τον παράγοντα αγγειακής ενδοθηλιακής ανάπτυξης (VEGF). Σε καρκινικά κύτταρα SCC, η 1,25-(OH)₂D₃ επάγει τον αγγειογενετικό παράγοντα ιντερλευκίνη 8 (IL-8), αλλά σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη η 1,25-(OH)₂D₃ διακόπτει την σηματοδότηση μέσω IL-8, οδηγώντας στην αναστολή των ενδοθηλιακών κυττάρων μετανάστευσης. Είναι ενδιαφέρον ότι σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα η αντι-αγγειογενετική δράση της 1,25-(OH)₂D₃ δεν έχει αποσαφηνιστεί σε βάθος, για αυτό απαιτούνται περαιτέρω πειράματα (27) (Lin, R. *et al.* 2002) (28) (Bao, B. Y *et al.*, 2006).

1.3.1.2 Η βιταμίνη D και ο ρόλος της στο νευρικό σύστημα

Η βιταμίνη D και κατά επέκταση το σύμπλοκο 1,25-(OH)₂D₃-VDR έχουν πολλά όργανα στόχους, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η βιταμίνη D (1,25-(OH)₂D₃) έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στη ρύθμιση των κυττάρων του νευρικού συστήματος, καθώς η 1,25-(OH)₂D₃ μπορεί να ρυθμίσει τον παράγοντα ανάπτυξης νεύρων (NGF), με αποτέλεσμα την παραγωγή των νευροτροφινών. Για παράδειγμα, η σύνθεση της νευροτροφίνης 3 (NT3) και ο νευροτροφικός παράγοντας (GDNF) ρυθμίζονται θετικά από τη 1,25-(OH)₂D₃, ενώ η νευροτροφίνη 4 (NT4) ρυθμίζεται αρνητικά (29)(Wrzosek, M. *et al.* 2013). Επίσης, η παραγωγή της νευροτροφίνης, η οποία εξαρτάται από τη 1,25-(OH)₂D₃ φαίνεται να παρέχει μια νευροπροστατευτική επίδραση σε κύτταρα του νευρικού συστήματος. Έτσι, περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι η 1,25-(OH)₂D₃ και τα συνθετικά ανάλογά της έχουν νευροπροστατευτική δράση έναντι αρκετών νευρο-παθολογικών καταστάσεων.

Ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών έχει χαρακτηριστεί για την νευροπροστατευτική δράση της 1,25-(OH)₂D₃ σε κύτταρα του νευρικού συστήματος. Αρχικά, η 1,25-(OH)₂D₃ ασκεί την νευροπροστατευτική της δράση μέσω της ρύθμισης της νευρικής ομοιόστασης του ασβεστίου. Αυτό επιβεβαιώνεται από την καταστολή των διαύλων ασβεστίου τύπου L στον ιππόκαμπο, λόγω της δράσης της 1,25-(OH)₂D₃, που οδηγεί σε νευροπροστασία των κυττάρων του ιππόκαμπου από διεγερτο-τοξικές προσβολές (30)(Brewer, L.D. *et al.* 2001). Επίσης, ένας άλλος νευροπροστατευτικός μηχανισμός, μεσολαβούμενος από τη 1,25-(OH)₂D₃ είναι η καταστολή της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS), ενός ενζύμου, το οποίο υπάρχει σε αυξημένα επίπεδα σε νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ κατά τη διάρκεια διαφόρων ασθενειών, όπως στην ισχαιμία, στη νόσο του Αλτσχάιμερ, στην ασθένεια του Parkinson, στο AIDS, σε ποικίλες μολύνσεις του ΚΝΣ, στη σκλήρυνση κατά πλάκας και στην αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) (31)(Garcion, E. *et al.* 1997). Έτσι, καθίσταται φανερός ο ρόλος της βιταμίνης D στις ασθένειες αυτές. Επίσης, σε αστροκύτταρα, έχει αναφερθεί η παροδική μείωση των επιπέδων του mRNA των μορίων TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων α) και M-CSF (παράγοντας διέγερσης μακροφάγων), η οποία επάγεται από τη 1,25-(OH)₂D₃ και τα συνθετικά της ανάλογα (32)(Furman, I. *et al.* 1996). Ένας άλλος νευροπροστατευτικός μηχανισμός μέσω της 1,25-(OH)₂D₃ αποτελεί η αντιοξειδωτική προστασία των νευρικών κυττάρων μέσω της επαγωγής των επιπέδων του ενζύμου γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, το οποίο

αποτελεί ένα μόριο-κλειδί στο κύκλο της γλουταθειόνης (33)(Shinpo, K. *et al.* 2000)
(Εικόνα 9).

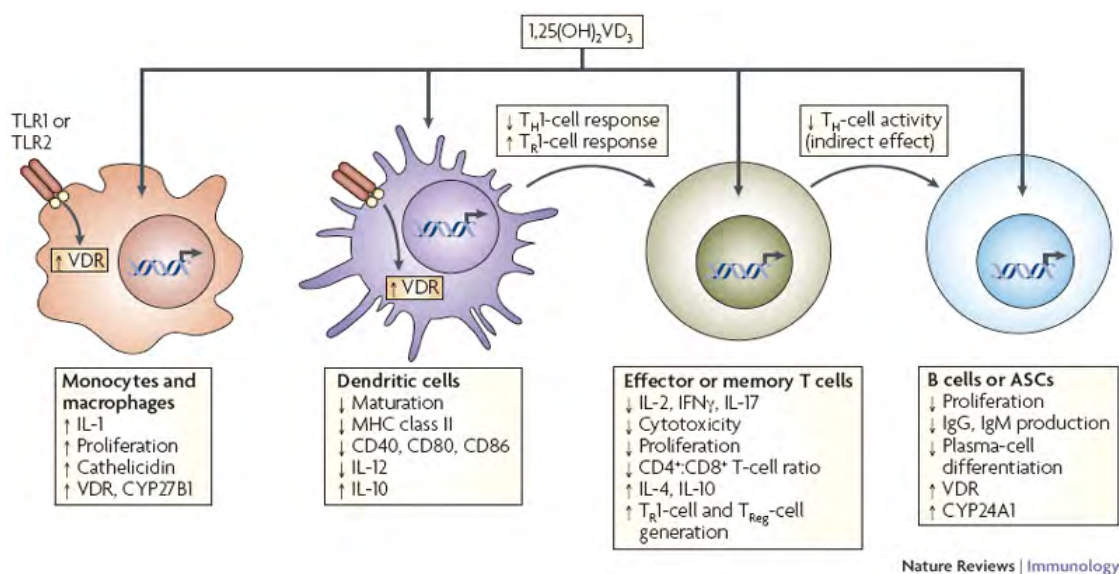


Εικόνα 9. Νευρο-προστατευτική δράση του 1,25-(OH)₂D₃. Στην εικόνα παρατηρούμε ότι τα νευρογλοιακά και νευρωνικά κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο VDR είναι κύτταρα-στόχοι για τη 1,25 - (OH) 2D₃. Στα αστροκύτταρα, η 1,25 - (OH) 2D₃ επάγει τη σύνθεση νευροτροφινών, συμπεριλαμβανομένων της NGF, NT3 και GDNF, και της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, η οποία συμμετέχει στις νευροπροστατευτικές επιδράσεις της 1,25 - (OH) 2D₃. Αναστολή της σύνθεσης του iNOS από 1,25 - (OH) 2D₃ είναι ένας άλλος τρόπος νευροπροστατευτικής δράσης της 1,25 - (OH) 2D₃, καθώς αυξημένα επίπεδα NO είναι τοξικά για τα κύτταρα (Garcion E., *et al.* 2002).

1.3.1.3 Ο ρόλος της βιταμίνης D στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η βιταμίνη D ασκεί πολυάριθμες δράσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Όσον αφορά την επίδραση της βιταμίνης D στα B κύτταρα, μελέτες

έδειξαν ότι το σύμπλοκο 1,25-(OH)₂D₃-VDR μπορεί να εκφράσει διάφορα γονίδια, καθώς σε συνθήκες έλλειψης της βιταμίνης D, βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών στα B κύτταρα. Βέβαια εκκρεμούν μελέτες που θα ταυτοποιήσουν επακριβώς αυτά τα γονίδια. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η 1,25-(OH)₂D₃ μπορεί να προστατεύσει τα B κύτταρα έναντι διαφόρων τύπων στρες επηρεάζοντας την έκφραση ενός αριθμού διαφορετικών γονιδίων-στόχων, όπως εκείνων που εμπλέκονται στην σηματοδότηση μέσω NF-κB, την παρουσίαση του αντιγόνου, και τη χημειοταξία. Ωστόσο, οι απαιτούμενες συμπληρωματικές μελέτες για να επιβεβαιωθεί ο ακριβής μηχανισμός και τα γονίδια- στόχοι, εκκρεμούν (34)(Heidi Wolden-Kirk et al., 2011). Επίσης, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και οδηγεί στη μετατόπιση από Th1 σε Th2 φαινότυπο και διευκολύνει την επαγωγή των T ρυθμιστικών κυττάρων. Αυτές οι επιδράσεις οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-17, IL-21) με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής των αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως της IL-10. Η βιταμίνη D επιδρά και στα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (DCs), αναστέλλοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών όπως τις IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 και TNF-α ενώ συγχρόνως αναστέλλει την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των DCs (όπως αποδεικνύεται και από τη μειωμένη έκφραση των μορίων MHC τάξης II, συνδιεγερτικών μορίων και της IL12). Η αναστολή της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των DCs είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για τα αυτοάνοσα νοσήματα όσο και για τη καταστολή της ανοχής (35-39) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Η δράση της Βιταμίνης D στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. (Rodrigo Mora J., et al. 2008)

Γενικά, υπάρχει μια σύνδεση της δράσης και των επιπέδων της βιταμίνης D με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), η ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), ο σακχαρώδης διαβήτης (AM), η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (SLE). Πειράματα έχουν επιβεβαιώσει την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων βιταμίνης D στην σκλήρυνση κατά πλάκας και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και φαίνεται ότι τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D ακόμα και σε εγκυμονούσες, μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο της γέννησης ενός παιδιού με σκλήρυνση κατά πλάκας, ρευματοειδή αρθρίτιδα ή/και παγκρεατική αυτοανοσία. Μελέτες απέδειξαν ότι στο 21% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθματώδη λύκο και νόσο του Sjogren, οι οποίοι είχαν χαμηλά επίπεδα Βιταμίνης D, η νόσος προχώρησε ραγδαία, εν αντιθέσει με τους ασθενείς που είχαν κανονικά επίπεδα Βιταμίνης D. Ιδιαίτερα, εντυπωσιάζει το γεγονός ότι, σύμφωνα με μελέτες, τα επίπεδα της βιταμίνης D είναι ανάλογα πολλές φορές και με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της κάθε προαναφερθείσας νόσου (40-41)(Munger KL, et al 2006)(Merlino LA, et al.2004).

Επίσης, με βάση την ικανότητα της 1,25-(OH)₂D₃ να καταστείλει την ανάπτυξη διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών και να παρατείνει την επιβίωση αλλομοσχεύματος, η 1,25-(OH)₂D₃ έχει χαρακτηριστεί ως μια ανοσοκατασταλτική ορμόνη. Όμως, σε in vivo πειράματα σε ποντίκια, η χορήγηση της 1,25-(OH)₂D₃ δεν απέτρεψε την μόλυνσή τους από τον ιό του απλού έρπητα ή τον *Candida albicans*.

1.3.1.4 Ο ρόλος της βιταμίνης D στην κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση είναι μια πολυσυστηματική νόσος, η οποία προσβάλλει πολλά όργανα στα οποία η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο. Μελέτες υποδεικνύουν ότι έμμεσα, η βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D σχετίζεται με την ελάττωση των συμπτωμάτων της κυστικής ίνωσης, καθώς η δράση της βιταμίνης D επηρεάζει τους πνεύμονες, το ανοσοποιητικό σύστημα, το εντερικό σύστημα και τα οστά (συστήματα τα οποία δυσλειτουργούν λόγω της κυστικής ίνωσης). Επιπλέον, ασθενείς με κυστική ίνωση παρουσιάζουν αρκετές επιπλοκές που μπορεί να αυξάνουν τις απαιτήσεις του σώματος σε βιταμίνη D. Έτσι, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα για την κυστική ίνωση στον πληθυσμό, δεδομένων των αρνητικών επιπτώσεων της ανεπάρκειας στα άτομα που νοσούν από την κυστική ίνωση. Για αυτό η αντιμετώπιση της ανεπάρκειας σε βιταμίνη D κινείται

σε δυο άξονες : την αποκατάσταση των επιπέδων της 25-OH D3 στον ορό, πάνω από τα 50 nmol / L και κυρίως, τη μακροχρόνια συντήρηση αυτών των επιπέδων 25-OH D3 στον ορό, χωρίς εμφανείς διακυμάνσεις (42)(Genevriere M. et al., 2006).

1.3.1.5 Ο ρόλος της βιταμίνης D στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και τύπου II

Βλάβες στα β-κύτταρα του παγκρέατος, λόγω της δράσης κυτοκινών και φλεγμονωδών παραγόντων μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεση του διαβήτη τύπου I. Η ανεπάρκεια, λοιπόν, της βιταμίνης D μειώνει σαφώς την έκκριση ινσουλίνης. Η αναστολή της λειτουργίας των β-κυττάρων (δηλαδή σύνθεση και έκκριση ινσουλίνης) που προκαλείται από την IL-1β ή την IFN-γ in vitro εμποδίζεται από τη δράση της 1,25-(OH)₂D₃ και τα ανάλογά της (MC903 και KH1060). Επίσης, στον διαβήτη τύπου II, φάνηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της βιταμίνης D και της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η βιταμίνη D μπορεί να λειτουργήσει με δύο πιθανούς τρόπους : μπορεί να δράσει άμεσα για να επάγει την έκκριση ινσουλίνης των β-κυττάρων με αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου μέσω των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου ή μπορεί να ενεργοποιεί τις ασβεστίο-εξαρτώμενες ενδοπεπτιδάσες των β-κυττάρων, οι οποίες επάγουν τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη. Σε περιφερικούς ιστούς-στόχους της ινσουλίνης, η βιταμίνη D μπορεί να ενισχύσει άμεσα τη δράση της ινσουλίνης μέσω της επαγωγής της έκφρασης των υποδοχέων της ινσουλίνης και μέσω της ρύθμισης των ενδοκυττάρων διαδικασιών της ινσουλίνης μέσω της ρύθμισης στη δεξαμενή του ασβεστίου (43)(Krishna G Seshardia et al., 2011).

1.4 Εκτίμηση επάρκειας βιταμίνης D για διαγνωστικούς σκοπούς

1.4.1 Καταλληλότερος μεταβολίτης για την εκτίμηση επάρκειας

Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 40 μεταβολίτες της βιταμίνης D (44) (Bouillon et al., 1995). Ωστόσο, οι περισσότεροι μεταβολίτες είναι χαμηλού ενδιαφέροντος, γιατί είτε βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά υγρά, είτε μεταβολίζονται γρήγορα σε άλλους μεταβολίτες. Επίσης μεταβολίτες όπως η προβιταμίνη D₃ και η βιταμίνη D₃ δεν αποτελούν καλούς δείκτες για την συνολική

εκτίμηση επάρκειας σε βιταμίνη D, γιατί αντιπροσωπεύουν το ποσοστό που έχει προέλθει από την έκθεση στον ήλιο και όχι από τις τροφές. Οι δύο μεταβολίτες με το περισσότερο κλινικό ενδιαφέρον είναι η 25-OHD και η 1,25-(OH)₂D. Η 1,25-(OH)₂D είναι περισσότερο δύσκολο και δαπανηρό να μετρηθεί από ότι η 25-OHD καθώς η 1,25-(OH)₂D βρίσκεται σε συγκεντρώσεις της τάξης των pg/ml ενώ η 25-OHD των ng/ml. Σε μερικές περιπτώσεις έλλειψης βιταμίνης D αυξάνεται η PTH επάγοντας την 1-α υδροξυλάση η οποία μετατρέπει όλα τα αποθέματα 25-OHD σε 1,25-(OH)₂D με αποτέλεσμα την εμφάνιση ψευδούς εικόνας φυσιολογικών επιπέδων 1,25-(OH)₂D μέχρι να εξαντληθούν τα αποθέματα της 25-OHD. Αξίζει να σημειωθεί ότι για να μειωθεί η 1,25-(OH)₂D θα πρέπει η ολική 25-OHD να έχει μειωθεί περίπου στα 4ng/ml (45) (Need et al., 2008). Τέλος, η 1,25-(OH)₂D έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής 4-15 ώρες, ενώ η 25-OHD έχει 21-30 ημέρες. Οι παραπάνω διαφορές μεταξύ των δύο μεταβολιτών καθιστούν την 1,25-(OH)₂D έναν φτωχό και δύσκολο δείκτη για την συνολική εκτίμηση επάρκειας σε βιταμίνη D, καθιστώντας την 25-OHD τον καταλληλότερο μεταβολίτη για την εκτίμηση και παρακολούθηση των επιπέδων της βιταμίνης D στον οργανισμό (46) (Fraser et al., 2013).

1.4.2 Κατηγορίες επιπέδων βιταμίνης D

Τα επίπεδα της 25-OHD έχουν χωριστεί σε τέσσερις κύριες κατηγορίες στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, προτείνεται ότι ο οργανισμός έχει έλλειψη για συγκεντρώσεις μικρότερες από 10ng/ml, από 10 έως 20 ng/ml έχει ανεπάρκεια, από 20 έως 70 ng/ml επάρκεια και ως τοξικά επίπεδα 25OHD υψηλότερες συγκεντρώσεις από 150ng/ml (47) (Wallace et al., 2010). Ως ιδανικό εύρος συγκεντρώσεων προτείνεται από 30 έως 70ng/ml (Πίνακας 2). Διάφορες μελέτες τα τελευταία χρόνια διαφωνούν μεταξύ τους και τείνουν να αλλάξουν το εύρος της κάθε κατηγορίας. Η σύγχυση αυτή συμβαίνει επειδή συνήθως αποκαλύπτονται και αποσαφηνίζονται νέοι ρόλοι και δράσεις της βιταμίνης D. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές συγκλίνουν στο ότι τα ιδανικά επίπεδα της βιταμίνης D σε κάποιες πληθυσμιακές ομάδες που ήδη πάσχουν ή έχουν προδιάθεση για την ανάπτυξη νοσημάτων που για την βέλτιστη αντιμετώπισή τους χρειάζονται υψηλά επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό τους (48) (Von Domarus C et al., 2011), (49) (Crutchley RD et al., 2011).

Κατηγορίες επιπέδων 25-OH D	Εύρος συγκεντρώσεων 25-OH D (ng/ml)
Τοξικά	>150
Υψηλά	70-150
Ιδανικά	30-70
Επάρκεια	20-70
Ανεπάρκεια	10-20
Έλλειψη	<10

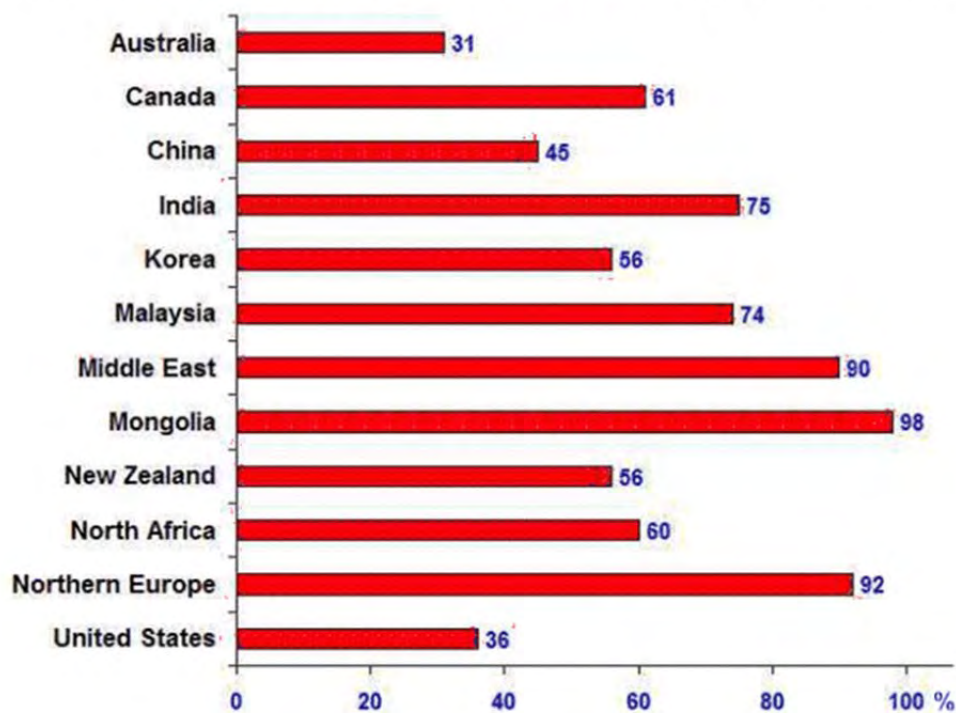
Πίνακας 2. Κατηγορίες επιπέδων 25-OH D (Wallace et al., 2010), (Cannel and Hollis, 2008).

1.4.3 Κλινικό ενδιαφέρον για επάρκεια σε βιταμίνη D

Το μεγαλύτερο βάρος του κλινικού ενδιαφέροντος, για την επάρκεια σε βιταμίνη D μέχρι τα τελευταία χρόνια, αφορούσε την κύρια δράση της βιταμίνης D και συγκεκριμένα συσχετιζόταν με τις ασθένειες-παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από την έλλειψη και ανεπάρκεια της βιταμίνης D (50) (Cannel and Hollis, 2008). Η σοβαρή έλλειψη της βιταμίνης D έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εντερική απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου διαταράσσοντας την ομοιόσταση τους και προκαλεί ραχίτιδα στα παιδιά και οστεοπόρωση στους ενήλικες (51) (Department of Health, 2010). Η λιγότερο σοβαρή έλλειψη της βιταμίνης D προκαλεί δευτερογενή υπερπαραθυρεοειδισμό και αύξηση του οστικού μεταβολισμού με ελάττωση της οστικής μάζας. Τα τελευταία χρόνια έχει φανεί από μεταanalύσεις ότι ακόμα και η ανεπάρκεια βιταμίνης D εμπλέκεται σε ένα μεγάλο εύρος κλινικών διαταραχών (52) (Bischoff-Ferrari et al., 2006), (53) (Holick et al., 2009) , όπως συχνών λοιμώξεων, αυτοάνοσων νοσημάτων, σακχαρώδη διαβήτη, καρκίνο, καρδιαγγειακές διαταραχές. Επίσης, ο σύγχρονος τρόπος ζωής, όπου ο πληθυσμός εκτίθεται στον ήλιο όλο και λιγότερο, αλλά και η έκθεση στον ήλιο γίνεται με τη χρήση αντιηλιακών σκευασμάτων που μπλοκάρουν την UVB ακτινοβολία που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της βιταμίνης D στο δέρμα, έχουν οδηγήσει ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού να έχει χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D, ακόμη και σε ηλιόλουστες χώρες, όπως οι χώρες της Βόρειας Αφρικής (Γράφημα 1). Επιπρόσθετα, πολλοί έγχρωμοι που έχουν μεταναστεύσει σε χαμηλής ηλιοφάνειας περιοχές, έχουν μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D. Λόγω του σκουρόχρωμου, από την μελανίνη,

δέρματος έχουν ανάγκη από περισσότερο χρόνο έκθεσης στη UV-B ακτινοβολία (50) (Cannel and Hollis, 2008).

Many countries have large % of population with less than 20 ng of vitamin D



Γράφημα 1. Εκατοστιαία ποσοστά πληθυσμού χωρών με μικρότερες συγκεντρώσεις από 20ng/ml.

Τέλος, τα τελευταία 20 χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις στις αναλυτικές προσεγγίσεις, όπως αυξημένη ακρίβεια και ειδικότητα, ενώ ακόμα και ο αυτοματισμός με ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης δίνουν τη δυνατότητα μέτρησης μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Οι κλινικές διαταραχές στις οποίες έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται η βιταμίνη D, ο σύγχρονος τρόπος ζωής, όσο και η τεχνολογική εξέλιξη στις αναλυτικές τεχνικές για την εκτίμηση επάρκειας που προσφέρουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ειδικότητα, έχουν οδηγήσει σε μια έκρηξη κλινικού και ερευνητικού ενδιαφέροντος και ζήτησης για αναλύσεις βιταμίνης D και των μεταβολιτών της. Πρόκειται για υποσχόμενο πεδίο όπου θα ανακαλυφθούν και αποσαφηνιστούν άγνωστες πτυχές για τον ρόλο της βιταμίνης D στην υγεία (46) (Fraser et al., 2013).

1.4.4 Βιταμίνη D, ένας δύσκολος αναλύτης

Η δυσκολία της ανάλυσης ευθύνεται σε πολλούς παράγοντες που αυξάνουν τις απαιτήσεις και την πολυπλοκότητα. Οι δυσκολίες στις αναλυτικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση επάρκειας σε βιταμίνη D ξεκινούν από την ειδικότητα τις κάθε τεχνικής, καθώς υπάρχουν πάνω από 40 μεταβολίτες της βιταμίνης D στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό εμπόδιο στην ανάλυση κάποιου μεταβολίτη της βιταμίνης D είναι η ευαισθησία της μεθόδου, αφού οι σημαντικότεροι μεταβολίτες για την εκτίμηση επάρκειας σε βιταμίνη D βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, δοκιμάζοντας τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού της κάθε μεθόδου (46) (Fraser et al., 2013). Η υδρόφοβη φύση της την καθιστά ασταθή σε υδάτινο περιβάλλον ελαττώνοντας τη διαλυτότητά της και διευκολύνει την προσκόλλησή της σε πλαστικές επιφάνειες κατά του χειρισμό του δείγματος. Στη σύνδεση με την VDBP, η οποία είναι ιδιαίτερα ισχυρή λόγω της υδροφοβικότητας της 25-OH D και απαιτεί βήμα εκχύλισης. Η 25-OH D χρειάζεται προσοχή στη διατήρηση του δείγματος, αφού έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και είναι ευαίσθητη στο φως του ηλίου. Μία ακόμη δυσκολία είναι η μέχρι πρόσφατα απουσία υλικών αναφοράς ή αναλυτικής μεθόδου αναφοράς (RMP). Το τελευταίο πρόβλημα επιλύθηκε το 2009 από τα πρότυπα υλικά αναφοράς του NIST και την αποδοχή της LC-MS/MS ως μέθοδο αναφοράς από το NIST(National Institute of Standards and Technology) και το πανεπιστήμιο του Ghent. Επίσης, αποτελέσματα υποβάλλονται στο διεθνές σχήμα DEQAS(vitamin D External Quality Assessment Scheme), το οποίο ιδρύθηκε το 1989 και ο σκοπός του είναι η εξασφάλιση της αναλυτικής αξιοπιστίας όλων των τεχνικών για τη μέτρηση της 25-OH D και της 1,25-(OH)₂ D. Από το DEQAS έχει παρατηρηθεί βαθμιαία μείωση στην ανακρίβεια μεταξύ εργαστηρίων τα τελευταία χρόνια από ποσοστό μεγαλύτερο του 30% το 1995 στο 15% το 2011. Η παραπάνω βελτίωση οφείλεται και στη χρήση των πρότυπων υλικών μεταφοράς κατά τη βαθμονόμηση. Για παράδειγμα, το 2012 εντάχθηκαν SRM βασισμένα σε ανθρώπινο ορό απαλλάσσοντας αρκετές μεθόδους από τα πρότυπα αναφοράς βασισμένα σε άλλες μήτρες, καθώς είχε διαπιστωθεί ότι διαφορετική μήτρα επηρέαζε την ανάλυση μη δίνοντας σωστή βαθμονόμηση. Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί και στην εκχύλιση 25-OH D από την VDBP (54) (Carter, 2012).

1.5 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση και αξιολόγηση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό

1.5.1 Δοκιμές ανταγωνιστικής δέσμησης (Competitive binding assays)

Οι δοκιμές ανταγωνιστικής δέσμησης προσδιορίζουν το βαθμό δέσμησης ενός επισημασμένου (Labeled) μορίου, συνήθως ραδιοεπισημασμένου σε ένα αντίσωμα ή μια πρωτεΐνη παρουσία μη επισημασμένου μορίου από το δείγμα που θέλουμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του μορίου. Επισημασμένα και μη επισημασμένα μόρια συναγωνίζονται για τις θέσεις δέσμησης στον συνδέτη και ο παρατηρούμενος βαθμός δέσμησης του επισημασμένου είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης του μη επισημασμένου μορίου στο δείγμα. Ο βαθμός δέσμησης προσδιορίζεται με μέτρηση υπολειμματικής ραδιενέργειας, φθορισμού ή φωτοδιαυγείας.

1.5.1.1 Δοκιμές ανταγωνιστικής δέσμησης σε πρωτεΐνη (CBPA –competitive binding protein assay)

Το 1970 αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της 25 (OH) D, στην οποία το δείγμα που περιείχε άγνωστη ποσότητα μη-σημασμένης 25-OH D επωάζονταν με γνωστής συγκέντρωσης ραδιενεργά σημασμένης 25-OH D₃ και ανταγωνίζονται για τη θέση δέσμησης σε μια πρωτεΐνη σύνδεσης. Οι μεταγενέστερες CBPA, χρησιμοποιούσαν πρωτεΐνη δέσμησης αρουραίου, όρνιθας ή και ανθρώπινης προέλευσης και επίσης κατάφεραν να μειώσουν την απώλεια αναλύτη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ανακτώντας μάλιστα ένα ποσοστό 82% του αρχικού αναλύτη. Επιπλέον, μειώθηκε ο χρόνος επώασης της ανάλυσης (1 ώρα έναντι 10 ημερών) και επιτεύχθηκε η μέτρηση σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων (55) (B.W.Hollis et al.2010).

Αν και η CBPA ήταν μια έγκυρη τεχνική, ήταν όμως σχετικά δύσχρηστη. Τεχνικοί έπρεπε να εξάγουν το δείγμα με τη χρήση οργανικών διαλυτών, να κατεργαστεί σε υγρό άζωτο και να καθαριστεί χρησιμοποιώντας χρωματογραφική στήλη. Έτσι, αυτή η δοκιμασία ήταν κατάλληλη για εργαστηριακή έρευνα, αλλά δεν πληρούσε τις υψηλές απαιτήσεις του κλινικού εργαστηρίου και η κύρια δυσκολία στη

μέτρηση της 25 (OH) D οφείλεται στο ίδιο το μόριο, καθώς η 25 (OH) D είναι ίσως η πιο υδρόφοβη ένωση που μετράται με αντιδράσεις πρωτεϊνοσύνδεσης, είτε αυτή είναι η CBPA είτε είναι ραδιοανοσοαντίδραση (RIA). Το γεγονός ότι η βιταμίνη D υφίσταται σε 2 μορφές, την 25 (OH) D₂ και την 25 (OH) D₃, δυσχεραίνει τον ποσοτικό προσδιορισμό με τη χρήση αντιδράσεων πρωτεϊνοσύνδεσης, όπως επίσης και η λιπόφιλη φύση της 25(OH) D, την καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτη στις αλληλεπιδράσεις της κατά τις αντιδράσεις πρωτεϊνοσύνδεσης. Οτιδήποτε υπάρχει στο δείγμα που θα αναλυθεί και δεν υπάρχει στο πρότυπο δείγμα βαθμονόμησης μπορεί να προκαλέσει μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις. Τα υποστρώματα αυτών των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων είναι συνήθως λιπίδια, αλλά και οτιδήποτε άλλο εμπεριέχεται στο δείγμα του ορού ή του πλάσματος. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να μεταβάλλουν την ικανότητα του συνδετικού παράγοντα, ή του αντισώματος ή της πρωτεΐνης δέσμευσης να συνδέσει με την 25 (OH) D στο δείγμα ή πρότυπο διάλυμα και έτσι να μειωθεί αισθητά η εγκυρότητα της ανάλυσης. Η αρχική διαδικασία του Haddad ξεπέρασε το πρόβλημα αυτό χρησιμοποιώντας χρωματογραφικό καθαρισμό του δείγματος πριν την εφαρμογή της CBPA. Έτσι, οι ερευνητές θέλησαν να απλοποιήσουν περαιτέρω αυτή τη δύσχρηστη CBPA για την ποσοτικοποίηση της 25 (OH) D, και ο Belsey και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα βελτιωμένο CBPA το 1974. Ο στόχος της CBPA δεύτερης γενιάς ήταν να παρακαμφθεί ο χρωματογραφικός καθαρισμός του δείγματος καθώς και να επιτευχθεί η ανάκτηση του δείγματος χρησιμοποιώντας την 3H-25 (OH) D₃. Ωστόσο, μετά από αρκετά χρόνια προσπάθειας, οι ερευνητές δεν ήταν σε θέση να επικυρώσουν τη δοκιμασία του Belsey λόγω προβλημάτων που προέρχονται από την εξαγωγή αιθανολικών δειγμάτων. Η CBPA για την 25 (OH) D είχε το πλεονέκτημα ότι είναι εξίσου ειδική τόσο για την 25 (OH) D₂ όσο και για την 25 (OH) D₃ και έτσι παρέχεται ένα "σύνολο" της τιμής της 25 (OH) D, αν η δοκιμασία ήταν έγκυρη και δεδομένης της σταθερότητάς της θα αποτελούσε μια ελκυστική ιδέα ώστε να ενσωματωθεί σε αυτοματοποιημένες αντιδράσεις άμεσης χημειοφωταύγειας. Έτσι, η Nichols Institute Diagnostics χρησιμοποίησε την προσέγγιση αυτή και οι ερευνητές του ανέπτυξαν την ανάλυση Advantage 25 (OH) D. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) αν και ενέκρινε την εν λόγω ανάλυση για κλινική χρήση, η ίδια η Nichols τελικά απέσυρε από την αγορά την ανάλυση Advantage 25 (OH) D, λόγω της τάσης της να υπερεκτιμά τη συνολική ποσότητα της 25 (OH) και της αδυναμίας της να ανιχνεύει την κυκλοφορούσα 25 (OH) D₂. Οι ατέλειες της δοκιμασίας αυτής έχουν

σχέση με την άμεση ανάλυση του δείγματος. Επί του παρόντος, η CBPA για την ανίχνευση/ποσοτικοποίηση της 25 (OH) D χρησιμοποιείται σπάνια. Επίσης, δεν μπορεί κανείς να συγκρίνει με ακρίβεια τα περισσότερα αποτελέσματα της CBPA για τις συγκεντρώσεις της 25 (OH) D από το παρελθόν με τιμές από τις τρέχουσες μεθόδους, επειδή υπάρχει ασυμβατότητα στη γραμμικότητα των τεχνικών (56)(W.D.Fraser et al. 2013).

1.5.1.2 Ανοσολογικές μέθοδοι (Immunoassays)

Οι ανοσολογικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1980, με την ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA), η οποία αρχικά χρησιμοποιούσε έναν επισημασμένο ιχνηθέτη, τον ^3H - 25(OH) D, ο οποίος στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από τον επισημασμένο ιχνηθέτη ^{125}I 25(OH) D καθώς προσέφερε υψηλότερη απόδοση. Αυτή η αντίδραση αποτέλεσε τη βάση για τα μεταγενέστερα συστήματα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας, τα οποία αυτοματοποιήθηκαν. Έτσι, δημιουργήθηκε μια RIA εκχύλισης δύο σταδίων, η οποία στη συνέχεια εξελίχθηκε σε μια ενζυμική ανοσοαντίδραση (EIA), που παρέκαμπε το στάδιο εκχύλισης και η οποία επίσης αυτοματοποιήθηκε. Αρκετοί κατασκευαστές δημιούργησαν ανοσοαντιδράσεις για την 25(OH) D, όπου ο διαλύτης εξαγωγής και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός αντικαταστάθηκαν από διάφορους ανασταλτικούς παράγοντες που εκχυλίζουν την 25(OH)D από την VDBP. Η προσέγγιση αυτή διευκολύνει την αυτοματοποίηση αυτών των αναλύσεων, αλλά πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι σε ορισμένες ανοσοαντιδράσεις, που χρησιμοποιούν αυτές τις τεχνικές, μπορεί να επηρεαστεί η αποτελεσματικότητά τους από τις διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της VDBP, πιθανώς λόγω μεταβλητότητας της μετατόπισης της 25(OH) D από την VDBP όπως επίσης και από την αυξημένη συγγένεια της 25(OH) D για ορισμένες παραλλαγές/ισομορφές της VDBP, με αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη διακύμανση των αποτελεσμάτων. Ένα πρόβλημα στις ανοσολογικές αντιδράσεις είναι η μεταβλητότητα που υπάρχει στην ανίχνευση της 25(OH) D₂. Μερικές αναλύσεις ισχυρίζονται ότι έχουν 100% διασταυρούμενη δραστηριότητα με εξωγενώς προστιθέμενη 25(OH) D₂ και 25(OH) D₃ και ως εκ τούτου ισοδύναμη μέτρηση των δύο μεταβολιτών. Άλλοι κατασκευαστές κατάφεραν να έχουν μικρότερη διασταυρούμενη δραστηριότητα με εξωγενώς προστιθέμενη 25(OH) D₂, όπως τα kit

της IDS και της Abbott ενώ ορισμένες αναλύσεις ήταν ειδικά σχεδιασμένες για να μετρούν μόνο την 25(OH) D3 (όπως τα προϊόντα της Roche). Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τη μεταβλητότητα των εμπορικών ανοσοαντιδράσεων για την ανίχνευση της 25(OH) D2 και αυτό οφείλεται σε διαφορετική ικανότητα δέσμευσης (συγγένεια) με την VDBP, καθώς η 25(OH) D3 παρουσιάζει ισχυρότερη συγγένεια-ικανότητα δέσμευσης από την 25(OH) D2. Όμως, περαιτέρω ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι ορισμένες αναλύσεις φαίνεται να έχουν προβλήματα ανίχνευσης της 25(OH) D2. Μελέτη για τη βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη), όπου έγινε φλεβική δειγματοληψία μετά από στοματική χορήγηση βιταμίνης D2 σε ανθρώπους, έδειξε σημαντική υποεκτίμηση των επιπέδων της 25(OH) D2 από τρεις διαφορετικές ανοσολογικές μεθόδους. Φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα της βιταμίνης D2, μετά από την στοματική της χορήγηση, τον επακόλουθο μεταβολισμό της και τη κυκλοφορία της στο αίμα, οι οποίες οδηγούν σε αλλαγμένη αναγνώριση της 25(OH) D2 in vivo από τα αντισώματα σε διάφορους ανοσοπροσδιορισμούς. Επί του παρόντος, φαίνεται ότι μόνο οι χρωματογραφικές μέθοδοι HPLC και LC-MS είναι σε θέση να ανταποκριθούν επιτυχώς στις προκλήσεις προσδιορισμού της 25(OH) D. Σχεδόν όλες οι ανοσοαντιδράσεις εμφανίζουν υψηλή διασταυρούμενη δραστηριότητα με την 24,25 (OH) 2D, της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται σε αυξανόμενη έκθεση στον ήλιο: και καθώς αυξάνεται η 25(OH) D και μεταβολίζεται σε 1,25 (OH) 2D, η τελευταία παρέχει και τα δύο υποστρώματα για την 24-υδροξυλάση (55-56) (B.W.Hollis et al.2010) (W.D.Fraser et al. 2013).

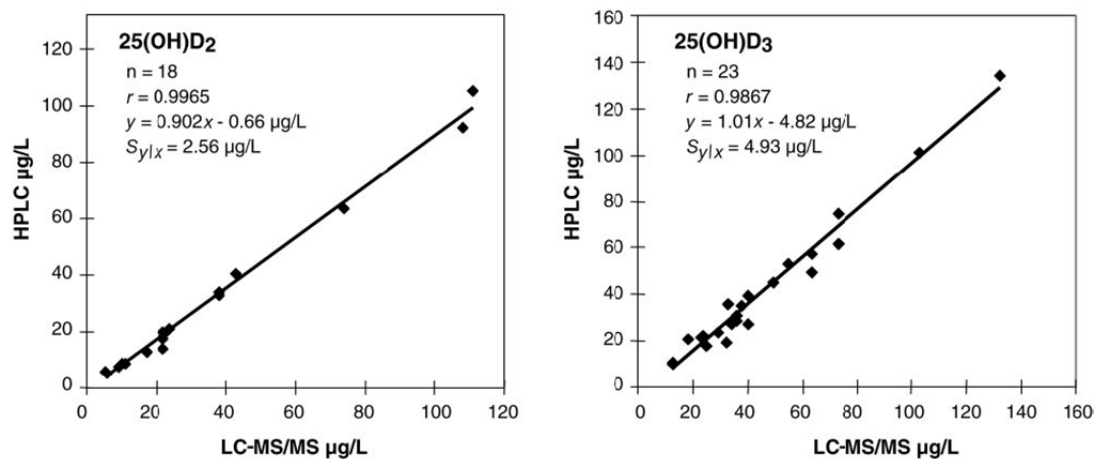
1.5.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

Οι πρώτες αναλύσεις HPLC που βασίζονται στην άμεση ανίχνευση μέσω ακτινοβολίας UV της 25(OH) D δημοσιεύθηκαν το 1977. Η διαδικασία περιλάμβανε μια δύσχρηστη εκχύλιση με χλωροφόρμιο/μεθανόλη, ακολουθούμενη από χρωματογραφικό διαχωρισμό και μετά ακολουθούσε ανίχνευση στο υπεριώδες φως. Οι βελτιώσεις της HPLC επικεντρώνονται γύρω από τη χρήση στηλών C18, τη βελτιστοποίηση των πρότυπων υλικών και τη βελτίωση της εκχύλισης του δείγματος. Ο συνδυασμός αυτών των προσεγγίσεων μείωσε τον χρόνο προσδιορισμού της βιταμίνης D με HPLC σε λιγότερο από 10 λεπτά. Οι τεχνικές εκχύλισης δείγματος μαζί με τις χρωματογραφικές μεθόδους, μπορούν να προσφέρουν αυξημένη

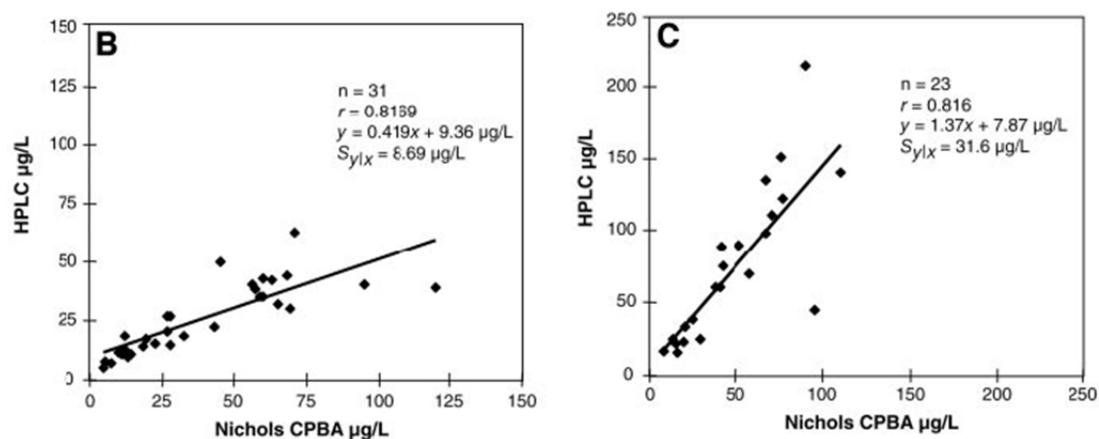
ειδικότητα για το μόριο που μας ενδιαφέρει, έτσι ώστε ο συνδυασμός HPLC και MS παράλληλα, (LC-MS / MS), να καθίσταται μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση των επιπέδων της 25-OH D3 και D2. Οι μέθοδοι LC-MS / MS έγιναν δημοφιλής στα μέσα της δεκαετίας του 2000, το σύντομο χρόνο εκτέλεσης και την ηλεκτρονική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων να συμβάλλουν στην υψηλότερη απόδοση και στην ευκολία χρήσης. Η δευτεριωμένη 25(OH) D2 και D3 ως εσωτερικό πρότυπο, βελτιώνει την ακρίβεια και επαληθεύει την ανάκτηση του δείγματος και με τη χρήση βελτιωμένων διεργασιών εκχύλισης επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των φωσφολιπιδίων, μειώνοντας έτσι το πρόβλημα της καταστολής ιόντων. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις επικεντρώνονται γύρω από τη μείωση της επεξεργασίας του δείγματος πριν από την χρωματογραφία και την εξάλειψη βημάτων που αλλοιώνουν το δείγμα, χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης. Όλες αυτές οι βελτιώσεις, συμβάλλουν στην αύξηση της απόδοσης, στην αύξηση της αξιοπιστίας και στην καλύτερη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας του προσδιορισμού με HPLC και LC-MS / MS για την ποσοτικοποίηση 25(OH) D (55-56) (B.W.Hollis et al.2010) (W.D.Fraser et al. 2013).

1.5.3 Συσχέτιση των τεχνικών / Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα

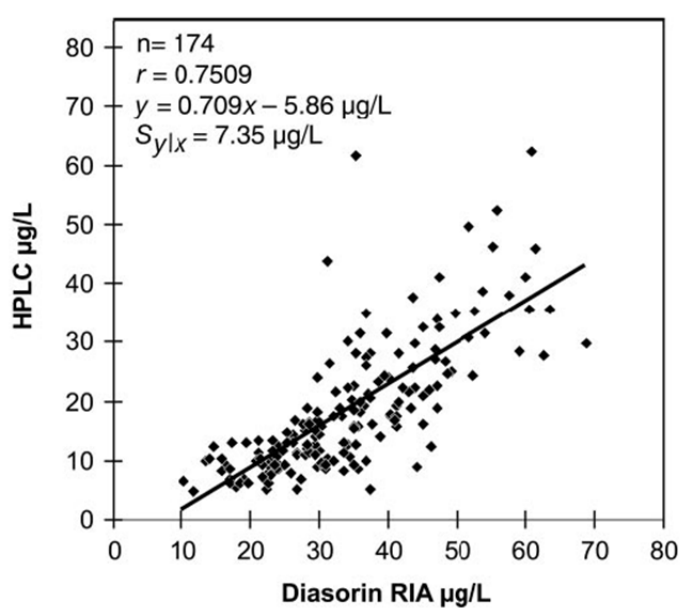
Το DEQAS όπως και η ερευνητική κοινότητα μελετά την αξιοπιστία των τεχνικών. Από αυτές τις μελέτες έχει αποδειχτεί η αξιοπιστία των χρωματογραφικών τεχνικών που είναι και οι μέθοδοι αναφοράς για τη μέτρηση της 25(OH) D έναντι στις ανοσολογικές τεχνικές. Τα αποτελέσματα της HPLC και LC/MS-MS συμφωνούν (Γράφημα 2) τόσο για την 25-OH D3 με συντελεστή συσχέτισης (r) 0,9867 και για την 25-OH D2 0,9965, γεγονός που δε συμβαίνει με τα αποτελέσματα των ανοσολογικών τεχνικών με τις μεθόδους αναφοράς παρουσιάζοντας χαμηλούς συντελεστές συσχέτισης (Γραφήματα 2, 3, 4) (57) (Lensmeyer et al., 2006).



Γράφημα 2. Συσχέτιση μεταξύ HPLC και LC/MS-MS



Γράφημα 3. Συσχέτιση μεταξύ HPLC και Nichols CPBA



Γράφημα 4. Συσχέτιση μεταξύ HPLC και Diasorin RIA

Η κάθε αναλυτική προσέγγιση για τη μέτρηση της 25(OH) D3 και 25(OH) D2 έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Συνοψίζοντας, τα πλεονεκτήματα των ανοσολογικών τεχνικών είναι το χαμηλό LOD και LOQ, το χαμηλό κόστος εξοπλισμού, το μικρό χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ανάλυση και το ότι δε χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό για το χειρισμό τους. Από την άλλη πλευρά τα μειονεκτήματά τους είναι το κόστος των αντιδραστηρίων, η ειδικότητα στην ανίχνευση των μεταβολιτών, καθώς δεν μπορούν να μετρήσουν ξεχωριστά την 25(OH) D3 και 25(OH) D2, οι υψηλές διακυμάνσεις όχι μόνο στην ίδια τεχνική αλλά και μεταξύ των τεχνικών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές υπερτερούν στο ότι έχουν χαμηλό LOD και LOQ, χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων, καθώς χρειάζονται μόνο την προμήθεια οργανικών διαλυτών. Ακόμη, έχουν υψηλή ειδικότητα διακρίνοντας την 25(OH) D3 από την 25(OH) D2, υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Τέλος, πρόκειται για μια καθολική τεχνική, που σημαίνει ότι το όργανο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλες αναλύσεις εκτός από την εκτίμηση των επιπέδων της. Από την άλλη υστερούν στο χρονικό διάστημα που διαρκεί η ανάλυση, απαιτείται βήμα απομόνωσης και καθαρισμού του δείγματος πριν την ανάλυση και τέλος απαιτεί για τη διεξαγωγή της ανάλυσης εξειδικευμένο προσωπικό. Συνοπτικά, τόσο τα πλεονεκτήματα όσο και τα μειονεκτήματα της κάθε τεχνικής παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) (57-58) (Lensmeyer et al., 2006) (A.M. Wallace et al.2010).

Χειροκίνητες ανοσοαντιδράσεις	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ
RIA μετά από εκχύλιση με διαλύτη	Diasorin	Η εκχύλιση με διαλύτη ελαχιστοποιεί τις μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις/παρεμβολές Σχετικά φθηνή	Πιο δύσχρηστη από τις άμεσες ανοσολογικές αντιδράσεις Δημιουργία ραδιενεργών αποβλήτων
RIA μετά από εκχύλιση με διαλύτη	IDS	Τεχνικά απλή μέθοδος Σχετικά φθηνή	Επιρρεπής σε αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα Δημιουργία

			ραδιενεργών αποβλήτων
Άμεση EIA	IDS	Τεχνικά απλή μέθοδος Σχετικά φθηνή	Επιρρεπής σε αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα Αδυναμία ανάκτησης της 25- υδροξυβιταμίνης D2
Αυτόματες ανοσοαντιδράσεις			
Laison Total	Diasorin	Χρησιμοποιείται εκτενώς Τεχνικά απλή μέθοδος Υψηλή απόδοση	Επιρρεπής σε αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα
iSYS	IDS	Τεχνικά απλή μέθοδος Υψηλή απόδοση	Επιρρεπής σε αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα Αδυναμία ανάκτησης της 25- υδροξυβιταμίνης D2
Elecys	Roche	Τεχνικά απλή μέθοδος Υψηλή απόδοση	Επιρρεπής σε αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα Ανιχνεύει μόνο τη 25- υδροξυβιταμίνη D3
Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού			
HPLC	Συνήθως αναπτύσσεται ή προσαρμόζεται στο εκάστοτε εργαστήριο	Η διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί ή να ημι- αυτοματοποιηθεί Ευδιάκριτη αλλά ταυτόχρονη μέτρηση της 25(OH)D2 και της 25(OH)D3 Ο χρήστης μπορεί να ελέγξει την τυποποίηση (standardization)	Απαιτεί Εξειδικευμένο προσωπικό Μερικές διαδικασίες απαιτούν μεγάλη ποσότητα δείγματος Απαιτείται περισσότερος

		Χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων Η εκχύλιση με διαλύτη ή η εκχύλιση στερεής φάσης ακολουθούμενη από χρωματογραφία ελαχιστοποιεί τις επιδράσεις της μήτρας και τις παρεμβολές	χρόνος για την ανίχνευση ουσιών σε σχέση με τις ανοσοαντιδράσεις Πιθανή παρέμβαση από το επιμερές C3-25(OH) D
LC/MS /MS	Συνήθως αναπτύσσεται ή προσαρμόζεται στο εκάστοτε εργαστήριο	Ευδιάκριτη αλλά ταυτόχρονη μέτρηση της 25(OH)D2 και της 25(OH)D3 Ο χρήστης μπορεί να ελέγξει την τυποποίηση (standardization) Χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων Εξαιρετικά ακριβείς όταν η μέθοδος είναι επαρκώς επικυρωμένη Η εκχύλιση με διαλύτη ή η εκχύλιση στερεής φάσης ακολουθούμενη από χρωματογραφία ελαχιστοποιεί τις επιδράσεις της μήτρας και τις παρεμβολές	Ακριβός εξοπλισμός Απαιτείται περισσότερος χρόνος για την ανίχνευση ουσιών σε σχέση με τις ανοσοαντιδράσεις Πιθανή παρέμβαση από το επιμερές C3-25(OH) D Εξειδικευμένο προσωπικό

Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικών ποσοτικοποίησης της 25-OH D (57-58) (Lensmeyer et al., 2006) (A.M. Wallace et al.2010).

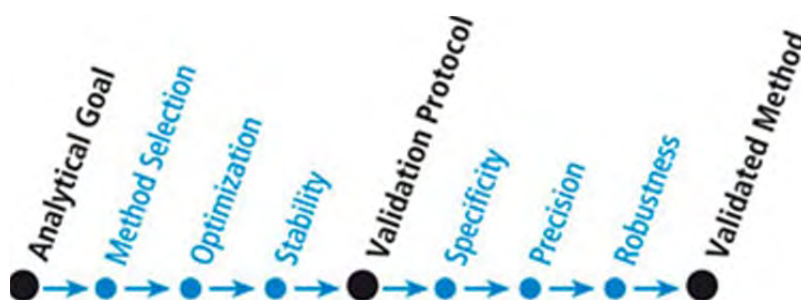
1.6 Επικύρωση μεθόδων

1.6.1 Επικύρωση μεθόδων

Η επικύρωση μεθόδων αποτελεί μία διαδικασία που αποδεικνύει, μέσω εργαστηριακών μελετών, ότι τα χαρακτηριστικά της επίδοσης της μεθόδου συναντούν τις απαιτήσεις για την προβλεπόμενη αναλυτική εφαρμογή. Η επικύρωση παρέχει μια διαβεβαίωση για την αξιοπιστία της μεθόδου κατά την προβλεπόμενη

χρήση. Τα εργαστήρια πρέπει να εκτελούν τις επικυρώσεις μεθόδων εναρμονισμένα με τους όρους που έχουν θέσει οι κυβερνήσεις και οι οργανισμοί. Το 1987 η FDA σχεδίασε τις προδιαγραφές στην τρέχουσα έκδοση της USP (United States Pharmacopeia) όπως αυτές νόμιμα αναγνωρίζονται. Πρόσφατα, εκδόθηκαν νέες λεπτομέρειες για τις προδιαγραφές, οι οποίες αναβάθμισαν την προηγούμενη κατευθυντήρια γραμμή, παρέχοντας έτσι περισσότερες πληροφορίες και εναρμονίζοντας αυτή τη κατευθυντήρια γραμμή με το ICH (International Conference on Harmonization) (59) (European medicines agency 2011).

Η επικύρωση μίας μεθόδου αποτελεί ένα μόνο κομμάτι της ολικής διαδικασίας επικύρωσης, η οποία εμπεριέχει τουλάχιστον τέσσερα ευδιάκριτα βήματα: την επικύρωση των software (λογισμικών), των hardware (οργανολογία), την επικύρωση της μεθόδου και την καταλληλότητα του συστήματος. Κάθε βήμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την τελική αποτίμηση της μεθόδου (Εικόνα 11) (59) (European medicines agency 2011).



Εικόνα 11. Βήματα επικύρωσης μιας μεθόδου.

1.6.2 Βελτιστοποίηση (Optimization)

Κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης, οι αρχικές συνθήκες, οι οποίες αναπτύχθηκαν κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της μεθόδου, βελτιώνονται ιδίως όσον αφορά το σχήμα και την ασυμμετρία της κορυφής, τις θεωρητικές πλάκες, την ικανότητα διαχωρισμού, το χρόνο έκλουσης (elution time), το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού και γενικά την ολική ικανότητά της να ποσοτικοποιεί τον επιθυμητό αναλύτη. Όποτε βελτιστοποιείται μια μέθοδος, πρέπει να γίνεται μια απόπειρα να παρέχονται αναλυτικά τα στοιχεία της ικανότητας (της μεθόδου), τα οποία απαιτούνται για να πληρεί τις προδιαγραφές που ορίστηκαν στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της μεθόδου. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης πρέπει να

εκτιμούνται συγκριτικά με τους στόχους της ανάλυσης. Έτσι, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της βελτιστοποίησης μπορεί να επαναπροσδιορίσει την αρχική διαδικασία και να αποκαλύψει επιπρόσθετες βελτιστοποιήσεις που είναι αναγκαίες. Όταν ληφθούν τα στοιχεία της ικανότητας της μεθόδου, πρέπει να αξιολογηθούν και αν κριθούν ενθαρρυντικά πρέπει να αξιολογηθεί η ποσοτική της απόδοση. Επιπρόσθετα, για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση μιας μεθόδου απαιτούνται αναλυτικά πρότυπα. Το πεδίο εφαρμογής της αξιολόγησης μιας μεθόδου θα πρέπει να είναι αρκετά ευρύ ώστε να περιλαμβάνει την παραγωγή πληροφοριών που είναι άμεσα χρησιμοποιήσιμες για την επιβεβαίωση του αναλύτη σε κάθε δείγμα, όπως απορρόφηση UV-εκπομπή φάσματος, ηλεκτροχημική συμπεριφορά απόκρισης (βολταμόγραμμα). Τα κριτήρια δε της βελτιστοποίησης πρέπει να προσδιορίζονται με γνώμονα τη συνολική διάρκεια της ανάλυσης, το συνολικό κόστος και την ακριβή ταυτοποίηση του αναλύτη. Η βελτιστοποίηση μιας μεθόδου μπορεί γενικά να ακολουθεί δυο προσεγγίσεις: τη χειροκίνητη ή την καθοδηγούμενη από υπολογιστή. Η χειροκίνητη εκδοχή εμπεριέχει την αλλαγή μιας πειραματικής μεταβλητής κάθε φορά, κρατώντας όλες τις άλλες μεταβλητές σταθερές. Οι μεταβλητές μπορεί να είναι η ροή, η σύσταση της κινητής ή της σταθερής φάσης, ο ρυθμός με τον οποίο μεταβάλλεται η σύσταση της κινητής φάσης στην περίπτωση που εφαρμόζεται στο σύστημα βαθμιδωτή ροή, η θερμοκρασία και το pH. Αυτή η εκδοχή είναι αργή και πιθανός ακριβή, όμως παρέχει καλύτερη κατανόηση των αρχών και της θεωρίας της μεθόδου. Στη δεύτερη εκδοχή, με τη χρήση υπολογιστών, αυτοματοποιείται η διαδικασία βελτιστοποίησης, μειώνοντας σημαντικά το χρόνο, το κόστος και την απαιτούμενη ενέργεια. Τέλος, για να εξασφαλιστούν αναλυτικά στοιχεία της ικανότητας (της μεθόδου), η βελτιστοποίηση της μεθόδου πρέπει να εναρμονιστεί με τις αρχές της ακρίβειας, της ορθότητας, των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, της γραμμικότητας και του εύρους (60) (H.V. Paithankar et al.2013).

1.6.3 Όροι και ορισμοί

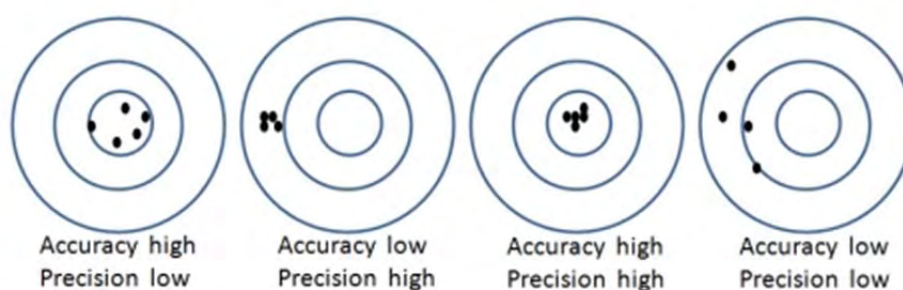
1.6.3.1 Ακρίβεια (Accuracy)

Ακρίβεια είναι η μέτρηση της σχέσης μιας αναλυτικής μεθόδου, ή η εγγύτητα της συμφωνίας-ταύτισης μεταξύ μιας συμβατικής, αληθινής ή κοινά αποδεκτής τιμής και της τιμής της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύσσεται. Για τον αναλύτη, οι

μετρήσεις της ακρίβειας, λαμβάνονται μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με την ανάλυση ενός πρότυπου υλικού ή μέσω της σύγκρισης με μια άλλη, καλά χαρακτηρισμένης τεχνικής. Η ακρίβεια μετράται από το ποσοστό ανάκτησης του αναλύτη στην ανάλυση. Τέλος, η ακρίβεια εξαρτάται άμεσα από την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).

1.6.3.2 Ορθότητα (Precision)

Η ορθότητα μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορίζεται με βάση το ποσοστό της συμφωνίας-ταύτισης μεταξύ διαφορετικών αποτελεσμάτων μιας επαναλαμβανόμενης ανάλυσης ενός ομογενούς δείγματος. Όπως και στην ακρίβεια, έτσι και η ορθότητα εξαρτάται από την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα, άλλα και από την μέση ορθότητα (Εικόνα 12). Ως επαναληψιμότητα ορίζουμε τα αποτελέσματα μιας μεθόδου που λειτουργεί σε σύντομο χρονικό διάστημα κάτω από ίδιες συνθήκες. Η αναπαραγωγιμότητα αναφέρεται στα αποτελέσματα συνεργατικών μελετών μεταξύ διάφορων εργαστηρίων. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων (της αναπαραγωγιμότητας) πρέπει να περιέχει την τυπική απόκλιση, την σχετική τυπική απόκλιση, τη διακύμανση του συντελεστή και το διάστημα εμπιστοσύνης. Τέλος, η μέση ορθότητα είναι το αποτέλεσμα ενδο-εργαστηριακών μεταβολών, όπως διαφορετικές μέρες, διαφορετικοί αναλυτές και διαφορετικά όργανα μέτρησης (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).



Εικόνα 12. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης ακρίβειας και ορθότητας.

1.6.3.3 Ειδικότητα (Specificity)

Ειδικότητα είναι η ικανότητα της εξειδικευμένης και ακριβούς μέτρησης του επιθυμητού αναλύτη παρουσία διαφόρων άλλων ουσιών που μπορεί να εμπεριέχονται στο δείγμα. Είναι μια μέτρηση του βαθμού παρεμβολής άλλων ενεργών συστατικών, εκδόχων, προσμείξεων και παραπροϊόντων. Η ειδικότητα είναι μια ιδιότητα της μεθόδου που διασφαλίζει ότι η μέγιστη απόκριση αντιστοιχεί σε μια μόνο ουσία. Για λόγους ταυτοποίησης, η ειδικότητα εκφράζεται από την ικανότητα διαχωρισμού δυο ουσιών παρόμοιας δομής. Για την δοκιμασία αντίδρασης/πρόσμιξης, η ειδικότητα εκφράζεται από την διάλυση δυο στενά εκλουόμενων ουσιών. Οι σύγχρονοι ανιχνευτές σειράς διόδων PDA (photodiode-array) αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο αξιολόγησης της ειδικότητας, καθώς μπορούν να συλλέξουν πολλά φάσματα σε διάφορα μήκη κύματος και να διαχωρίσουν πολύ μικρές φασματικές και χρωματογραφικές διαφορές. Παρόλα αυτά, μπορεί να απαιτηθεί και η χρήση της φασματομετρίας μάζας (MS), έτσι ώστε να παρέχεται πολύτιμη και ολοκληρωμένη πληροφορία στα πλαίσια της επικύρωσης μεθόδων (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).

1.6.3.4 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (Limit of Detection and Limit of Quantitation)

Το όριο της ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί, αλλά όχι αναγκαστικά ποσοτικά. Το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και ορθότητα κάτω από τις προαποφασισμένες συνθήκες λειτουργίας της μεθόδου. Οι τιμές LOD και LOQ εκφράζονται ως συγκέντρωση. Αυτά τα όρια συνήθως καθορίζονται από το λόγο σήματος/θορύβου (Signal to Noise). Σύμφωνα με τις οδηγίες του μηχανήματος της HPLC που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή, ο λόγος σήματος/θορύβου υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$S/N = \frac{2 \times \text{Peak Height}}{\text{Noise}}$$

όπου Peak Height είναι το ύψος της κορυφής της ουσίας που μας ενδιαφέρει να υπολογίσουμε το LOD και LOQ, ενώ το Noise είναι το ύψος του θορύβου πλησίον της κορυφής στο τρέχον δείγμα που αναλύεται. Ο τύπος για τον προσδιορισμό του LOD και LOQ είναι:

$$LOD = 3 \times \frac{[C]}{S/N} \quad LOQ = 10 \times \frac{[C]}{S/N}$$

όπου [C] η συγκέντρωση του τρέχοντος δείγματος από το οποίο προέκυψε ο υπολογισμός του S/N.

Επίσης, υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003). Από την καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται η τεταγμένη επί την αρχή, η κλίση και η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή. Η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(Y - Y_i)^2}{n - 2}}$$

Το LOD και LOQ υπολογίζεται από τους παρακάτω τύπους:

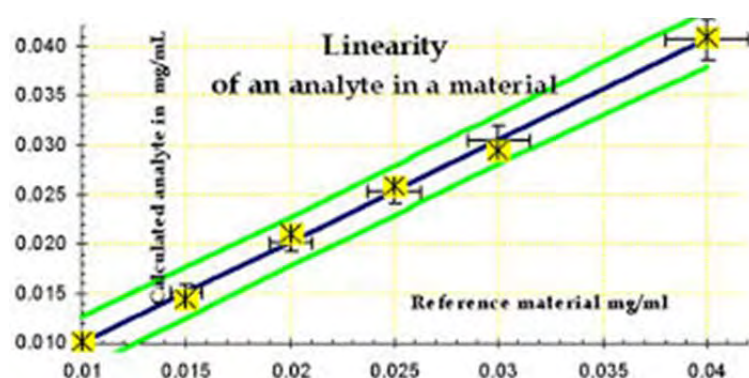
$$LOD = \frac{3\sigma}{a} \quad LOQ = \frac{10\sigma}{a}$$

όπου σ η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή και a η κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης. Να σημειωθεί ότι το LOQ που θα προσδιοριστεί από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι μεγαλύτερο από αυτό που θα προσδιοριστεί από το θόρυβο του μηχανήματος. Υπάρχουν και οι οπτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των LOD και των LOQ, οι οποίες δεν απαιτούν τη χρήση οργάνων, όπως η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

1.6.3.5 Γραμμικότητα και εύρος (Linearity and Range)

Η γραμμικότητα είναι η ικανότητα μιας μεθόδου να εξάγει αποτελέσματα, τα οποία είναι άμεσα αναλογικά στη συγκέντρωση του αναλύτη, εντός ενός συγκεκριμένου εύρους. Το εύρος είναι το διάστημα μεταξύ των ανώτερων και των κατώτερων επιπέδων του αναλύτη, που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, ορθότητα και γραμμικότητα χρησιμοποιώντας μια συγκεκριμένη μέθοδο ανάλυσης. Το εύρος συνήθως εκφράζεται στις μονάδες με τα αποτελέσματα των

δοκιμών μιας αναλυτικής μεθόδου. Οι κατευθυντήριες γραμμές της ICH, καθορίζουν ένα ελάχιστο πρότυπο πέντε συγκεντρώσεων καθώς και ένα ελάχιστο εύρος, το οποίο εξαρτάται από το είδος της μεθόδου. Επί παραδείγματι, για αναλύσεις (ποσοτικού προσδιορισμού), το ελάχιστο εύρος είναι από 80% - 120% των συγκεντρώσεων-στόχου, ενώ για μια δοκιμή περιεκτικότητας ομοιομορφίας, το ελάχιστο εύρος είναι από 70% - 130% της συγκέντρωσης-στόχου (Εικόνα 13) (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).



Εικόνα 13. Παράδειγμα γραμμικότητας μιας μεθόδου προσδιορισμού ενός αναλύτη σε σχέση με ένα υλικό αναφοράς.

1.6.3.6 Αντοχή (Ruggedness)

Η αντοχή μιας μεθόδου, ορίζεται από την κατευθυντήρια γραμμή της USP, ως ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που αποκτήθηκαν από την ανάλυση ίδιων δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες, όπως από διαφορετικά εργαστήρια, όργανα ανάλυσης, αντιδραστήρια, χρονικές περιόδους και θερμοκρασίες. Είναι, δηλαδή, η μέτρηση της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων σε μια πληθώρα διαφορετικών συνθηκών, οι οποίες μεταβάλλονται από εργαστήριο σε εργαστήριο και από αναλυτή σε αναλυτή (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).

1.6.3.7 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας ορίζεται ως η μέτρηση της ικανότητάς της να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές αλλά εσκεμμένες αλλαγές στις παραμέτρους της διαδικασίας, παρέχοντας έτσι ενδείξεις για την καταλληλότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου και των διαδικασιών της, κατά την ομαλή χρήση της. Η ανθεκτικότητα μιας μεθόδου εκτιμάται μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους της μεθόδου, όπως το pH, την ιονική ισχύ και τη θερμοκρασία και εν συνεχεία καθορίζοντας την επίδραση (των παραμέτρων) στα αποτελέσματα της μεθόδου. Επιπλέον, εάν τα αποτελέσματα μιας μεθόδου είναι ευαίσθητα σε αυτές τις αλλαγές των παραμέτρων, τότε αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να ελεγχθούν επαρκώς και να περιλαμβάνονται στην καταγραφή της μεθόδου ως προφύλαξη (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).

1.6.3.8 Καταλληλότητα του συστήματος (System suitability)

Αν και τυπικά δεν αποτελεί αναγκαίο κομμάτι της επικύρωσης μιας μεθόδου, σύμφωνα με το USP, οι δοκιμές καταλληλότητας του συστήματος αποτελούν την ολοκλήρωση της επικύρωσης των χρωματογραφικών τεχνικών. Αυτές οι δοκιμές χρησιμοποιούνται για να επαληθεύσουν ότι η αναπαραγωγικότητα του συστήματος είναι επαρκής ώστε να διεξαχθεί η ανάλυση. Οι δοκιμές της καταλληλότητας ενός συστήματος βασίζονται στο γεγονός ότι ο εξοπλισμός, τα ηλεκτρονικά και οι αναλυτικές διεργασίες αποτελούν ένα ολοκληρωμένο σύστημα, το οποίο μπορεί να αξιολογηθεί αυτόνομα (61-62) (F.T Peters et al.2002) (B.K.Matuszewski et al.2003).

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά και αναλώσιμα

Αποκτήθηκε ακετονιτρίλιο($\geq 99,9\%$) από την Sigma-Aldrich (Αθήνα, Ελλάδα), MeOH ($\geq 99,9\%$) από την Sigma-Aldrich (Αθήνα, Ελλάδα), φιαλίδιο 1ml με διάλυμα 25-OH D3 100 $\mu\text{g/ml}$ σε αιθανόλη (98%), φιαλίδιο 1ml με διάλυμα 25-OH D2 100 $\mu\text{g/ml}$ σε αιθανόλη (98%), αποκτήθηκε συνενωμένο πλάσμα από τυχαία άτομα από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό νερό (αντίσταση 18M Ω) που παράχθηκε στο εργαστήριο από Milli-Q® σύστημα υπερκαθαρού νερού, χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα για σύριγγες 0,2 μm , 13mm PVDF από την SUPELCO Analytical, γυάλινες πιπέτες Hamilton 10 μl , 100 μl , 250 μl και 1000 μl .

2.2 Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αποθηκεύτηκαν προστατευμένα από την ακτινοβολία του φωτός στους -4°C . Οι συγκεντρώσεις τους ελέγχονταν κάθε εβδομάδα μετρώντας την απορρόφηση στα 265nm και χρησιμοποιώντας συντελεστές απορρόφησης αναφοράς: $\epsilon_{264.5\text{nm}} = 19400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για την 25(OH)D₂, $\epsilon_{265\text{nm}} = 18000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για την 25(OH)D₃. Η βαθμονόμηση του οργάνου εκτελούνταν καθημερινά με βαθμονομημένα διαλύματα συνενωμένου πλάσματος εμβολιασμένα με 25-OH D₃ και D₂. Το διάλυμα παρακαταθήκης με συγκέντρωση 800ng/ml 25-OH D₃ και D₂ παρασκευάστηκε προσθέτοντας σε 984 μl (50:50, ACN:H₂O), 8 μl 25-OH D₃ και 8 μl 25-OH D₂. Το πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 20ng/ml 25-OH D₃ και D₂ παρασκευάστηκε προσθέτοντας σε 1170 μl (50:50, ACN:H₂O), 30 μl από το διάλυμα παρακαταθήκης με συγκέντρωση 800ng/ml 25-OH D₃ και D₂. Τα διαλύματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν από συνενωμένο πλάσμα εμβολιάζοντας με τις εκάστοτε ποσότητες και μετά ακολουθούσε κατακρύμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος και εκχύλιση των 25-OH D₃ και D₂ από τη συνδέουσα πρωτεΐνη τους (VDBP) χρησιμοποιώντας ακετονιτρίλιο σε αναλογία με το πλάσμα 1:1 (Πίνακας 4). Παρομοίως παρασκευάστηκαν και τα δείγματα ελέγχου (Πίνακας 5).

Συγκέντρωση (ng/ml)	Συνενωμένο πλάσμα	Διάλυμα παρακαταθήκης 800 ng/ml	Ακετονιτρίλιο (μl)
0	800	-	800
10	790	10	800
20	780	20	800
40	760	40	800
100	700	100	800

Πίνακας 4. Παρασκευή διαλυμάτων βαθμονόμησης.

Συγκέντρωση (ng/ml)	Συνενωμένο πλάσμα	Δ-μα παρακαταθήκης 800 ng/ml	Ακετονιτρίλιο (μl)
10	948	12	960
50	900	60	960
70	876	84	960

Πίνακας 5. Παρασκευή δειγμάτων ελέγχου.

2.3 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και εκχύλιση των 25-OH D3/D2

Η διαδικασία επεξεργασίας πλάσματος ξεκινά με τον εμβολιασμό του με το διάλυμα παρακαταθήκης 25-OH D2&3 με συγκέντρωση 800ng/ml. Ακολουθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος και η εκχύλιση των 25-OH D3 και D2 από τη συνδέουσα πρωτεΐνη τους (VDBP) αναμιγνύοντας το εμβολιασμένο πλάσμα με ακετονιτρίλιο σε αναλογία με το πλάσμα 1:1. Η διαδικασία κατακρήμνισης των πρωτεϊνών πλάσματος και εκχύλισης των 25-OH D3 και D2 από τη συνδέουσα πρωτεΐνη τους (VDBP) πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

α). Στο πλάσμα προστίθεται ίδιος όγκος ακετονιτρίλιου σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα σε μέγεθος κατάλληλο για τη φυγόκεντρο. Η πρόσθεση του ακετονιτρίλιου πραγματοποιείται στάγδιν και με αργό ρυθμό (διάρκεια 1-2λεπτά) με παράλληλη ανάδευση στο vortex σε χαμηλή ταχύτητα.

β). Φυγοκέντρωση στις 4.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και θερμοκρασία 20°C.

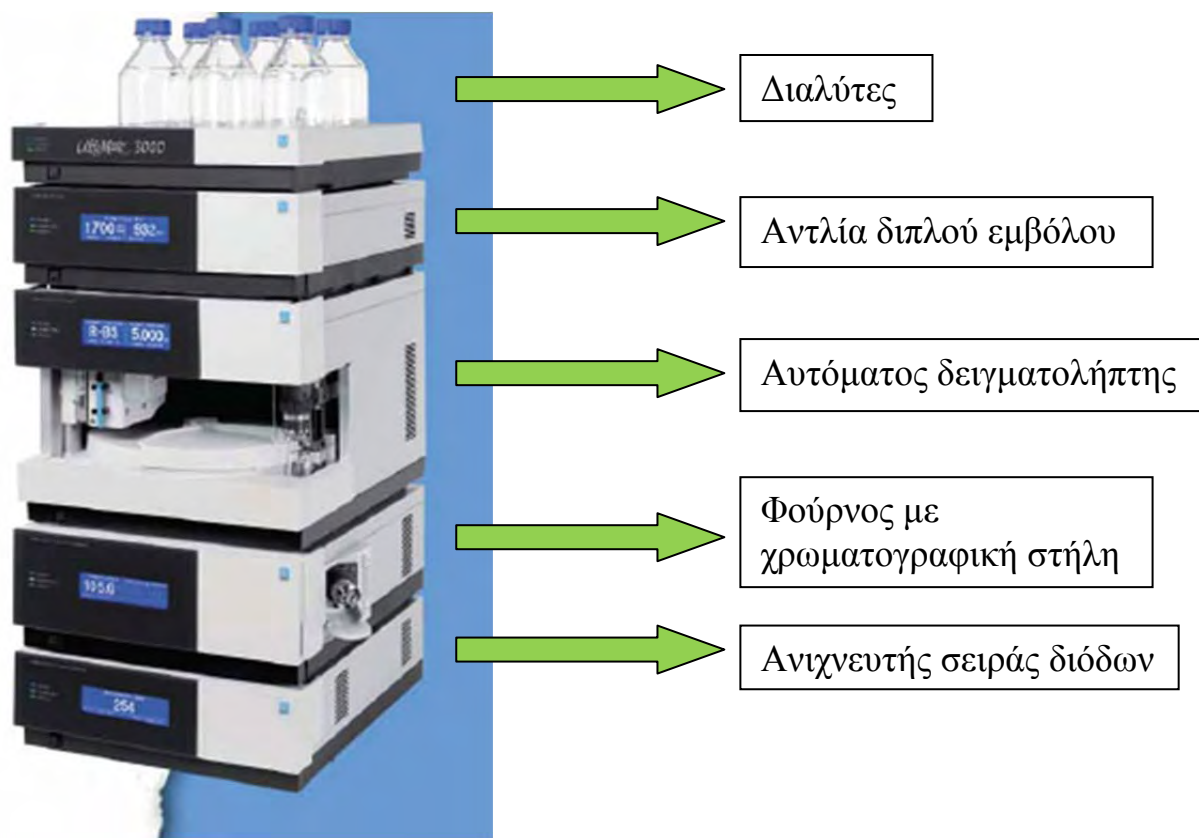
γ). Συλλογή υπερκείμενου με σύριγγα και με αργό ρυθμό προς αποφυγή προσρόφησης του ιζήματος.

δ). Αδειασμα του περιεχόμενου της σύριγγας σε φιαλίδιο για την HPLC με φίλτρο PVDF 0,2μm, 13mm.

2.4 Σύστημα HPLC και On-line SPE

2.4.1 Σύστημα HPLC

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC από την εταιρία Dionex και μοντέλο Ultimate 3000 με δυνατότητα εφαρμογής-επέκτασης για on-line SPE. Το σύστημα αποτελείται από πέντε κύρια μέρη. Τα μέρη αυτά είναι ο χώρος που τοποθετούνται οι φιάλες των διαλυτών, ο χώρος που βρίσκονται οι δύο αντλίες μαζί με σύστημα βαθμιδωτής ροής για την κάθε μία. Ακόμη, το σύστημα διαθέτει αυτόματο δειγματολήπτη με θερμοστατούμενο χώρο αποθήκευσης των δειγμάτων και τον εγχυτή, όπου βρίσκεται η σύριγγα με δυνατότητα αλλαγής της από 100μl σε 500μl. Επίσης, διαθέτει θερμοστατούμενο φούρνο όπου τοποθετείται η χρωματογραφική στήλη. Τέλος, ένα από τα σημαντικότερα μέρη είναι ο ανιχνευτής, ο οποίος στο σύστημα μας είναι ορατού/υπεριώδους σειράς διόδων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σύστημα HPLC Dionex Ultimate3000 με ανιχνευτή Uv/Vis με σειρά διόδων.

2.4.2 On-line SPE

Μία ανάλυση με εν σειρά εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελείται από τρία κύρια βήματα (Σχήμα 3). Στο πρώτο βήμα το δείγμα μεταφέρεται από τον αυτόματο δειγματολήπτη στη στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης. Στο βήμα αυτό θα πρέπει να διασφαλιστεί ότι οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν συγκρατούνται στη στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και όλες οι υπόλοιπες ουσίες του δείγματος, όπως πρωτεΐνες και μικρά βιομόρια να μην συγκρατούνται και να αποβάλλονται μέσω της ροής στα απόβλητα. Στο δεύτερο βήμα πρέπει να μεταφερθεί το δείγμα στην αναλυτική στήλη που συγκρατήθηκε στη στήλη SPE από το πρώτο βήμα. Στη συνέχεια πρέπει να μεταφερθούν επιλεκτικά οι αναλύτες χωρίς να παρασυρθούν άλλες ουσίες που είναι επιθυμητό να παραμείνουν στη στήλη SPE. Επίσης κατά τη μεταφορά αυτή θα πρέπει να επιτευχθεί η εστίαση των αναλυτών στην αναλυτική στήλη, συμβάλλοντας έτσι

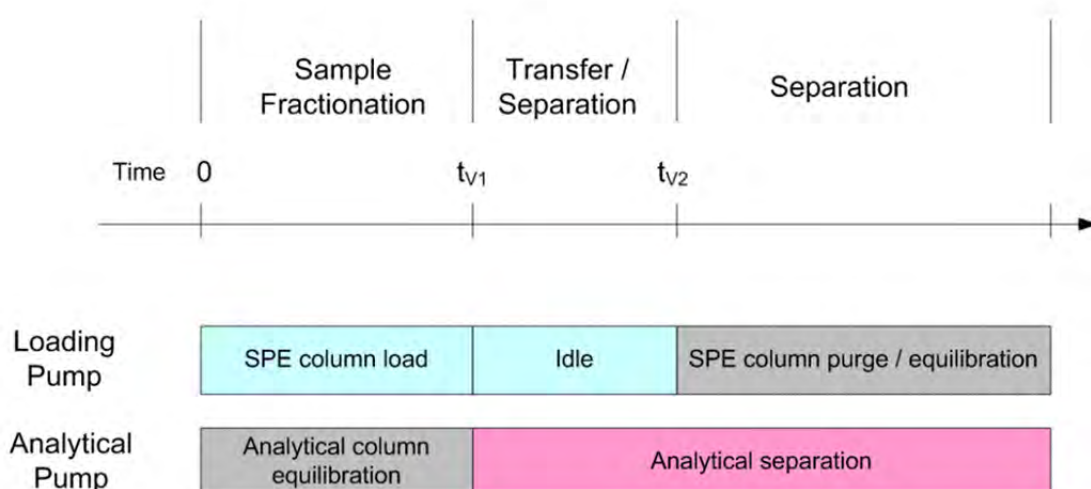
στην απόδοση της ανάλυσης. Τέλος, στο τρίτο βήμα αναπτύσσεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Διαχωρίζονται επιτυχώς οι αναλύτες και ποσοτικοποιούνται.



Σχήμα 3. Κύρια βήματα στην εν σειρά εκχύλιση στερεάς φάσης.

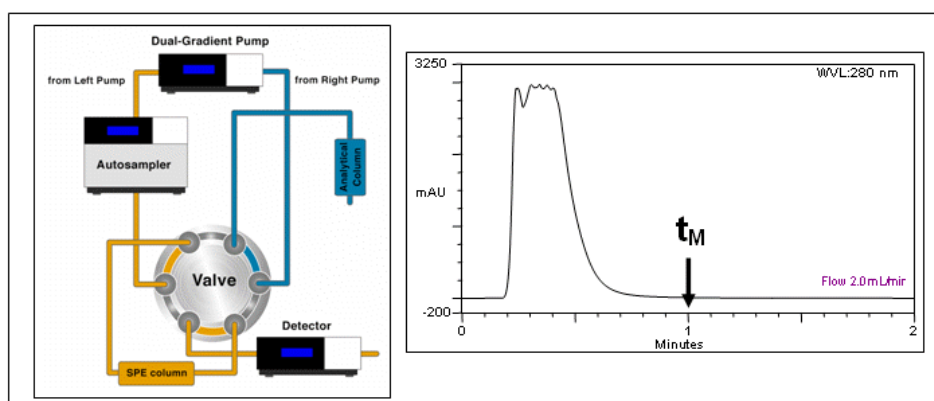
Η μετάβαση από βήμα σε βήμα είναι λεπτή διαδικασία και σημαντικό ρόλο παίζουν οι χρόνοι t_{v1} και t_{v2} που θα επιλεγθούν για το γύρισμα της βαλβίδας που ρυθμίζει τη μετάβαση των βημάτων (Εικόνα 15). Το λογισμικό υπολογίζει τους δύο χρόνους για τη ρύθμιση του γυρίσματος της βαλβίδας μέσω τριών πειραμάτων μέσω των οποίων βρίσκονται τρεις σημαντικοί χρόνοι.

On-Line SPE-LC Column Switching Times



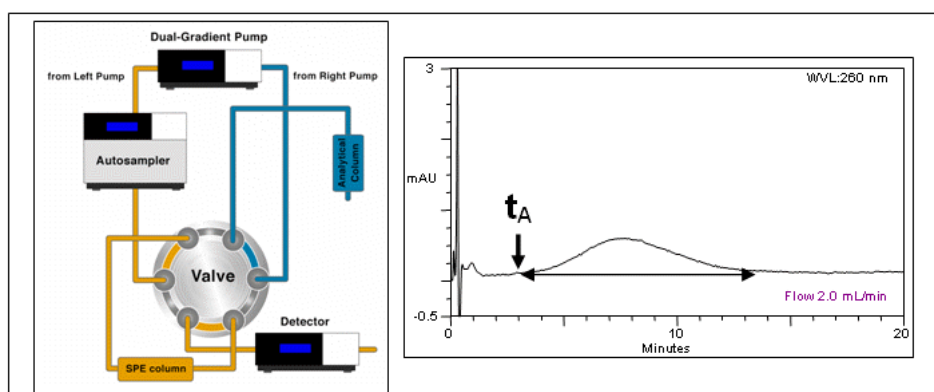
Εικόνα 15. Χρόνοι γυρίσματος της βαλβίδας της εν σειρά εκχύλισης στερεάς φάσης.

Πρώτα υπολογίζεται ο χρόνος που χρειάζεται να απομακρυνθούν οι ουσίες της μήτρας $t(M)$ από τη στήλη SPE. Για να υπολογιστεί ο χρόνος έκλουσης της μήτρας συνδέεται η SPE στήλη απευθείας με τον ανιχνευτή, εγχύεται το δείγμα στο σύστημα και σημειώνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία έχει εκλουστεί η μήτρα (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Χρόνος έκλουσης μήτρας

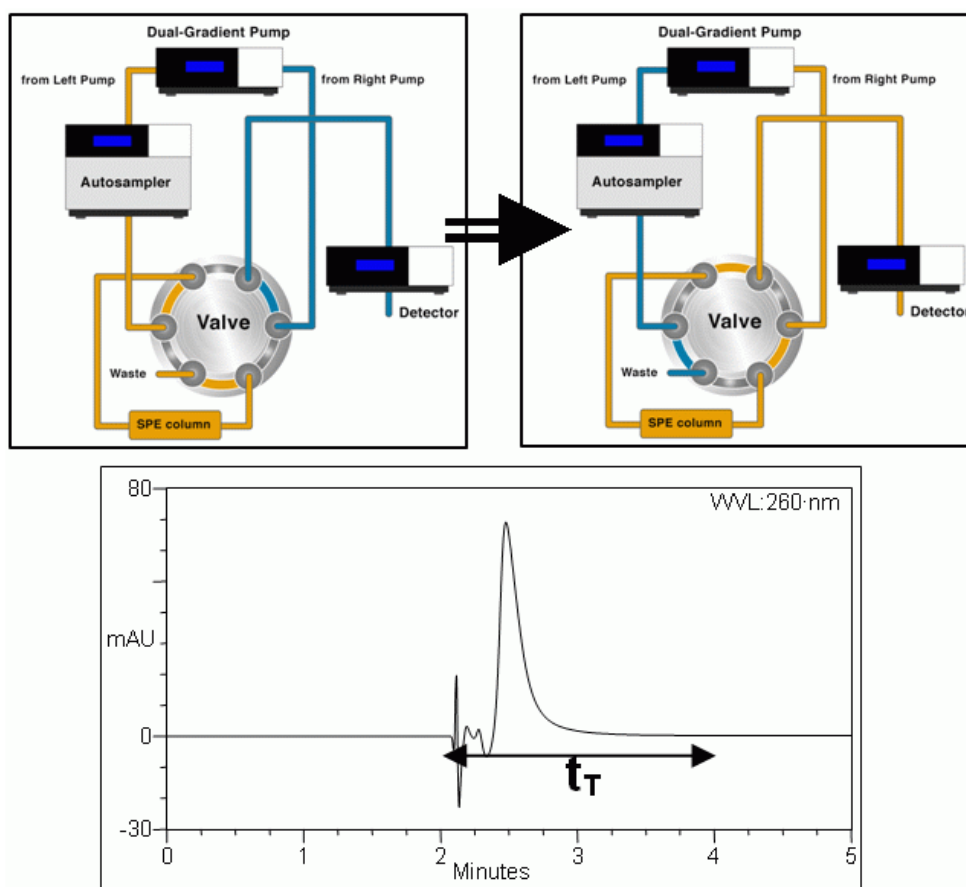
Στη συνέχεια πρέπει να βρεθεί ο χρόνος που ξεκινά να εκλούεται από τη στήλη SPE ο αναλύτης $t(A)$. Για να υπολογιστεί ο $t(A)$, η SPE στήλη συνδέεται απευθείας με τον ανιχνευτή. Μετά την έγχυση πρότυπου διαλύματος αναλυτών σημειώνεται ο χρόνος που ξεκινά να εκλούεται ο αναλύτης. Ο χρόνος αυτός θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον $t(M)$ διασφαλίζοντας την ανάκτηση του αναλύτη (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Χρόνος έκλουσης αναλύτη.

Τέλος υπολογίζεται ο χρόνος που χρειάζεται να εκλουσθούν οι αναλύτες μετά το γύρισμα της βαλβίδας $t(T)$. Από το σύστημα αφαιρείται η αναλυτική στήλη και τη

θέση της παίρνει μία ένωση. Εγχύεται πρότυπο διάλυμα αναλυτών, γυρίζει η βαλβίδα και οι αναλύτες εκκλύονται στον ανιχνευτή (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Χρόνος που απαιτείται για την έκλυση των αναλυτών μετά το γύρισμα της βαλβίδας $t(T)$.

Ακολουθήθηκαν οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες για την εύρεση των τριών χρόνων που απαιτούνται από το λογισμικό για τον υπολογισμό των χρόνων $t_{(V1)}$ και $t_{(V2)}$. Για το χρόνο έκλυσης της μήτρας $t(M)=1,7\text{min}$ πραγματοποιήθηκε έγχυση 500μl αποπρωτεϊνομένου πλάσματος (χρωματογράφημα 1). Για το χρόνο έκλυσης του αναλύτη $t(A)=1,82\text{min}$ πραγματοποιήθηκε έγχυση 500μl πρότυπου διαλύματος με 100ng/ml 25-OH D3 και D2 (χρωματογράφημα 2). Για το χρόνο έκλυσης του αναλύτη $t(T)=0,63\text{min}$ μετά το γύρισμα της βαλβίδας, όπου εφαρμόζεται αντίστροφη ροή στην εν σειρά στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης πραγματοποιήθηκε έγχυση 500μl πρότυπου διαλύματος με 100ng/ml 25-OHD3 και D2 (χρωματογράφημα 3).

3 Ανάπτυξη μεθόδου

3.1 Βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης για την εύρεση της αποδοτικότερης μεταφοράς των αναλυτών από την SPE στήλη στην αναλυτική στήλη.

Δοκιμάσθηκαν επτά διαφορετικές αναλογίες διαλυτών για την εύρεση της καταλληλότερης σύστασης με στόχο την αποδοτικότερη μεταφορά των αναλυτών από την SPE στήλη στην αναλυτική στήλη. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με κριτήρια το ποσοστό ανάκτησης, τις θεωρητικές πλάκες, το εύρος των κορυφών και το βέλτιστο διαχωρισμό. Ως η καταλληλότερη αναλογία διαλυτών για τη μεταφορά επιλέχθηκε αυτή με ACN/H₂O (55/45) (Πίνακας 6).

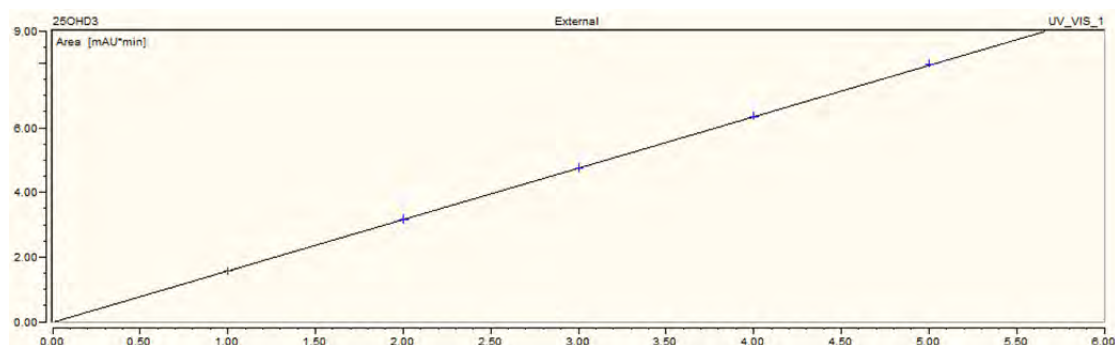
	AREA D3 + D2	N D3	N D2	Resolution	Peak Width D3	Peak Width D2
85ACN_15H2O	1,71	11397	12525	1,83	0,14	0,15
70ACN_30H2O	1,83	4827	4903	3,17	0,37	0,45
60ACN_40H2O	1,76	9616	10679	3,7	0,38	0,41
55ACN_45H2O	1,84	11368	11747	3,62	0,38	0,43
50ACN_50H2O	1,86	13031	13317	3,65	0,38	0,43
45ACN_55H2O	1,60	16355	17160	3,93	0,35	0,39
30ACN_70H2O	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 6. Βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης για την εύρεση της αποδοτικότερης μεταφοράς των αναλυτών από την SPE στήλη στην αναλυτική στήλη.

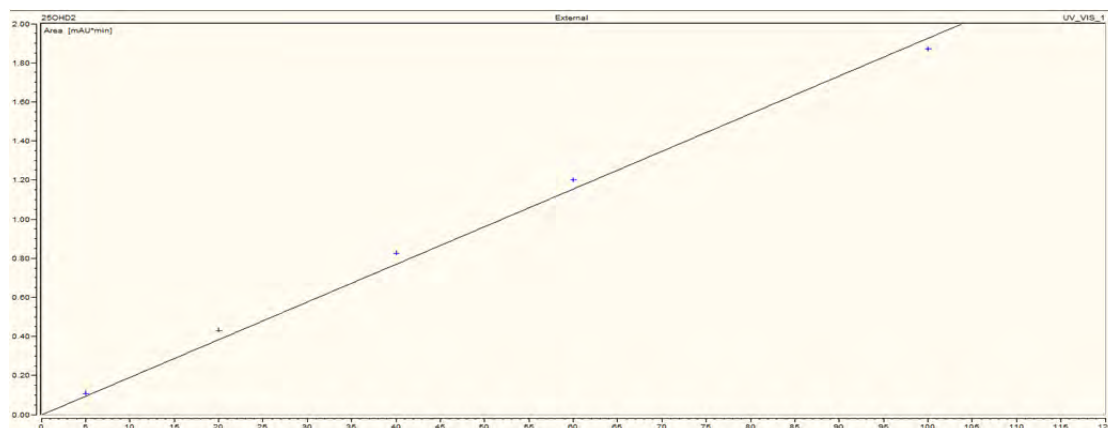
3.2 Πείραμα διαφυγής (breakthrough) με αύξηση του όγκου έγχυσης από 100-500μl με συγκέντρωση 100ng/ml.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης, μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους είναι ο όγκος διαφυγής που καθορίζει το μέγιστο όγκο που είναι δυνατό να φορτωθεί σε μία στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης. Η διαφυγή των αναλυτών μπορεί να λάβει χώρα

κατά την φόρτωση μεγάλου όγκου διαλύματος σε στήλη εκχύλισης όταν μέρος της ποσότητας των αναλυτών συμπαρασυρθεί μαζί με το δείγμα και εκλουσθεί μαζί με αυτό. Ο όγκος διαφυγής εξαρτάται από τον όγκο της έγχυσης στη στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης, από τη συγκέντρωση των αναλυτών στο διάλυμα που φορτώνεται στη στήλη, τη ροή, τη θερμοκρασία και τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Ο όγκος διαφυγής για μία εν σειρά συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης καθορίζει την ποσότητα του αναλύτη, η οποία μπορεί να απομονωθεί και εξαρτάται από τις ιδιότητες κινητικής της συσκευής, από τις παραμέτρους συγκράτησης και από τη ροή του δείγματος που φορτώνεται στη συσκευή από το σύστημα. Ο όγκος διαφυγής μπορεί να περιγραφεί ή να παρουσιαστεί από την καμπύλη διαφυγής. Είναι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του όγκου του δείγματος που περνούν από τη στήλη SPE. Η καμπύλη διαφυγής προκύπτει από την αντιστοίχιση της παρατηρούμενης συγκέντρωσης του αναλύτη με τον όγκο του κλάσματος. Για τον έλεγχο αποτελεσματικής συγκράτησης των αναλυτών από την στήλη αυξήσαμε σταδιακά το όγκο έγχυσης από 100 έως 500μl παρατηρώντας τα εμβαδά των κορυφών της 25-(OH)D3 και D2. Η γραμμικός ανάλογη αύξηση των εμβαδών που παρατηρήθηκε (Σχήμα 7) (Σχήμα 8) αποδείκνυε απουσία διαφυγής μέρους του αναλύτη. Σε αντίθετη περίπτωση δεν θα υπήρχε παρατηρούμενη γραμμική αύξηση των εμβαδών και μετά από το σημείο κορεσμού της στήλης θα υπήρχε κάμψη της καμπύλης.



Σχήμα 7. Γραμμική αύξηση εμβαδών 25-(OH)D3 σε σχέση με τον όγκο έγχυσης του δείγματος .



Σχήμα 8. Γραμμική αύξηση εμβαδών 25-(OH)D2 σε σχέση με τον όγκο έγχυσης του δείγματος .

3.3 Επίδραση ενδογενών ουσιών του πλάσματος στην απόκριση του οργάνου

Η παρουσία των ενδογενών ουσιών του πλάσματος στο επεξεργασμένο δείγμα μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις αυξάνοντας ή μειώνοντας το παρατηρούμενο σήμα του ανιχνευτή. Αυτό μπορεί να συμβεί επειδή στο χρόνο έκλουσης του αναλύτη μπορεί να εκλούνται και άλλες ουσίες επηρεάζοντας το σήμα του ανιχνευτή σε αυτόν το χρόνο. Μία ένδειξη ότι συμβαίνει κάτι τέτοιο είναι ότι στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος στο χρόνο έκλουσης των αναλυτών σε δείγμα μη εμβολιασμένου συνενωμένου πλάσματος να μην παρατηρούμε ομαλή γραμμή βάσης. Επίσης ο ανιχνευτής στο δικό μας σύστημα είναι σειράς διόδων και μας δίνει τη δυνατότητα εξακρίβωσης της καθαρότητας της κορυφής του αναλύτη μας σε δείγμα συνενωμένου πλάσματος εμβολιασμένου με τον αναλύτη. Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο αυτό κάναμε σύγκριση των εμβαδών (σήμα του ανιχνευτή) των προτύπων διαλυμάτων της 25-(OH)D3 20 ng/ml σε καθαρό διαλύτη CH₃CN:H₂O και σε εμβολιασμένο πλάσμα στην ίδια συγκέντρωση μετά την επεξεργασία για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Τα παρατηρούμενα εμβαδά ήταν ίδια (Πίνακας 7), γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει καμία παρεμπόδιση των μετρήσεων από ενδογενείς ουσίες του πλάσματος.

$$\text{Επίδραση μήτρας} = \frac{\text{Εμβαδό (συνενωμένο πλάσμα εμβολιασμένο μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών)}}{\text{Εμβαδό (πρότυπα διαλύματα)}}$$

20 ng/ml	Area (n=2)		
	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμός πλάσματος μετά από την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών	Επίδραση της μήτρας
	0,22	0,22	0,99
	0,22	0,21	
Μέσος όρος	0,22	0,22	

Πίνακας 7. Υπολογισμός επίδρασης της μήτρας του δείγματος.

3.4 Αποδοτικότητα εκχύλισης των αναλυτών από τη μήτρα του πλάσματος μέσω της διαδικασίας κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και απομόνωσης των αναλυτών από τη συνδέουσα πρωτεΐνη.

Οι μεταβολίτες 25-(OH)D3/D2 είναι έντονα υδρόφοβες ουσίες, αδιάλυτες στο νερό και κυκλοφορούν στον ανθρώπινο οργανισμό ισχυρά συνδεδεμένες με τον υδρόφιλο φορέα τους, τη συνδέουσα πρωτεΐνη της βιταμίνης D. Η απομόνωση των μεταβολιτών γίνεται με τη βοήθεια των οργανικών διαλυτών. Επιλέχτηκε το ακετονιτρίλιο που εκτός από την απομόνωση των μεταβολιτών εξασφαλίζει και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του πλάσματος από το δείγμα, καθιστώντας το πιο κατάλληλο για την έγχυση στο σύστημα της HPLC. Η παρουσία των πρωτεϊνών μπορεί να φράξει την αναλυτική στήλη.

Για την εκτίμηση της απόδοσης της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών και την εκχύλιση των 25-OH D3 και D2 από τη συνδέουσα πρωτεΐνη τους (VDBP) πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κορυφών των 25-OH D3 και D2 σε διαλύματα συνενωμένου πλάσματος εμβολιασμένου με 20ng/ml ακολουθώντας δύο διαφορετικές διαδικασίες παρασκευής. Όσον αφορά την πρώτη διαδικασία παρασκευής το συνενωμένο πλάσμα εμβολιάστηκε πριν επεξεργαστεί για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, ενώ στη δεύτερη διαδικασία εμβολιάστηκε μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Πίνακας 8). Τα αποτελέσματα του πειράματος δείχνουν πολύ καλή αποδοτικότητα εκχύλισης (93%) των 25-(OH)D3/D2 από τη μήτρα.

20 ng/ml	Area (n=2)		
	Εμβολιασμός πλάσματος μετά από την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών	Εμβολιασμός πλάσματος πριν από την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών	Αποδοτικότητα εκχύλισης των αναλυτών από την πρωτεΐνη
	0,22	0,21	0,93
	0,21	0,19	
Μέση τιμή	0,22	0,20	

Πίνακας 8. Υπολογισμός αποδοτικότητας εκχύλισης των 25-(OH)D3/D2 από τη μήτρα.

3.5 Εκτίμηση απόδοσης της on-line SPE

Η αποδοτικότητα της εν σειρά SPE περιλαμβάνει την απόδοση ανάκτησης των αναλυτών που περιέχεται στο δείγμα και την απόδοση της εστίασης των αναλυτών στην αναλυτική στήλη. Για να εξακριβωθεί η απόδοση της εν σειρά SPE πραγματοποιήθηκε έγχυση όγκου 50μl και 100μl με πρότυπα διαλύματα των αναλυτών συγκέντρωσης 200ng/ml και 100ng/ml αντίστοιχα, απευθείας στη στήλη και στη συνέχεια έγχυση όγκου 500μl με πρότυπο διάλυμα των αναλυτών συγκέντρωσης 20ng/ml. Η ανάκτηση των αναλυτών βρίσκεται από το λόγο των αντίστοιχων εμβαδών των κορυφών και η εστίαση από το λόγο των θεωρητικών πλακών των αντίστοιχων κορυφών (Πίνακες 9 και 10). Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος βρέθηκε ότι έχουμε ικανοποιητική ανάκτηση και εστίαση των αναλυτών.

Μεταβολίτης	On-line SPE έγχυση 500μl με 20 ng/ml		Έγχυση απευθείας στην αναλυτική στήλη 50μl με 200ng/ml		Ανάκτηση	Εστίαση
	Area 1	N1	Area 2	N2	Area 2/ Area 1	N2/N1
25-OH D3	0,38	11868,33	0,44	18358	0,87	0,65
25-OH D2	0,42	12527,33	0,46	17960	0,90	0,70

Πίνακας 9. Εκτίμηση απόδοσης της on-line SPE.

Μεταβολίτης	On-line SPE έγχυση 500μl με 20 ng/ml		Έγχυση απευθείας στην αναλυτική στήλη 100μl με 100ng/ml		Ανάκτηση	Εστίαση
	Area 1	N1	Area 2	N2	Area 2/ Area 1	N2/N1
25-OH D3	0,38	11868,33	0,44	17686	0,87	0,67
25-OH D2	0,42	12527,33	0,47	16968	0,89	0,74

Πίνακας 10. Εκτίμηση απόδοσης της on-line SPE.

4 Εκτίμηση απόδοσης της μεθόδου

4.1 Γραμμικότητα της μεθόδου

Ο έλεγχος γραμμικότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων με κλινικό ενδιαφέρον, δηλαδή από 10 έως 100ng/ml και συγκεκριμένα στα επίπεδα συγκεντρώσεων των 10, 20, 40 και 100 ng/ml 25-OH D3 και D2. Από τα εμβάδα των κορυφών των 25-OH D3 και D2 στα χρωματογραφήματα εξήχθηκε καμπύλη βαθμονόμησης. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε 5 φορές σε 5 διαφορετικές ημέρες. Η μέθοδος εμφάνισε καλή γραμμικότητα και για τους δύο αναλύτες (Πίνακας 11). Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης σε κάθε καμπύλη βαθμονόμησης πλησιάζει την τιμή της μονάδας, άρα υπάρχει πολύ καλός συσχετισμός μεταξύ των εμβαδών των κορυφών και της συγκέντρωσης των διαλυμάτων βαθμονόμησης.

	25-(OH)D3			25-(OH)D2		
Day	R	A	b	R	a	B
1	0,979	0,007	0,083	1,000	0,009	-0,003
2	0,999	0,011	0,012	0,999	0,009	-0,023
3	0,997	0,011	0,028	1,000	0,009	-0,008
4	0,996	0,008	0,088	0,998	0,011	-0,027
5	0,988	0,011	0,048	0,999	0,009	-0,017
Mean	0,992	0,010	0,052	0,999	0,009	-0,015
SD	0,008	0,002	0,033	0,001	0,001	0,010

Πίνακας 11. Γραμμικότητα της μεθόδου.

4.2 Ειδικότητα, όριο ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού

Από τη μέθοδο που αναπτύχθηκε εκλούνται δύο κύριες κορυφές με απορρόφηση στα 265nm, οι οποίες ανήκουν στην 25(OH)D3 και στην 25(OH)D2, με

χρόνο έκλουσης $t_{RD3}=10,1\text{min}$ και $t_{RD2}=10,6\text{min}$ αντίστοιχα. Η καθαρότητα των κορυφών επιβεβαιώθηκε από το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) σε τρία σημεία της κορυφής. Οι δύο αναλύτες διαχωρίζονται πλήρως και μπορούν να ανιχνευθούν με όριο ανίχνευσης LOD (25-OH D3)=1,1ng/ml και LOD(25-OH D2)=1,4ng/ml. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από το S/N που προέκυψε σε πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης στην κρίσιμη, για το κλινικό ενδιαφέρον, συγκέντρωση των 20ng/ml. Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού τέθηκαν τα 10 ng/ml για την 25-OHD3 και D2 που είναι το χαμηλότερο πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκε. Οι αναλύτες σε αυτή τη συγκέντρωση μετρήθηκαν με την απαιτούμενη ακρίβεια και ορθότητα μέσω πρότυπου διαλύματος ελέγχου. Συγκεκριμένα, η μέση συγκέντρωση που βρέθηκε είναι εντός του 20% της πραγματικής τιμής και ο συντελεστής μεταβλητότητας των μετρήσεων δεν ξεπερνά το 20%(Πίνακας με δείγματα ελέγχου). Το LOQ=10ng/ml είναι επαρκές για να καθοριστούν τα επίπεδα της 25-OH D3 και D2 που ορίζονται από το Ινστιτούτο Ιατρικής (Institute of Medicine) (έλλειψη < 12ng/ml, ανεπάρκεια 12-20ng/ml, επάρκεια 20-50ng/ml και τοξικότητα >50ng/ml).

4.3 Ορθότητα και ακρίβεια της μεθόδου

Για την εκτίμηση της ακρίβειας και της ορθότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν δείγματα ελέγχου, δύο φορές το κάθε ένα για πέντε ημέρες. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευαζόντουσαν καθημερινά σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 10, 50 και 70 ng/ml. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε επίπεδο, όπως επίσης και η ακρίβεια και η ορθότητα των μετρήσεων από μέρα σε μέρα. Τόσο η ακρίβεια, όσο και η ορθότητα της ποσοτικοποίησης των αναλυτών από τη μέθοδο που αναπτύχθηκε πληρούν τα κριτήρια μιας έγκυρης μεθόδου για κλινικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, η παρατηρούμενη ορθότητα δεν υπερβαίνει το 15% για τα δείγματα ελέγχου που αναλύθηκαν και ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων που βρέθηκαν είναι εντός του 15% από τις πραγματικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

Συγκέντρωση	Υπολογιζόμενη συγκέντρωση, ng/ml
-------------	----------------------------------

δείγματος ελέγχου, ng/ml				
	Μέσος όρος	CV, %	Bias, %	Accuracy, %
25-(OH)D3				
10	11,3	9,7	13,0	113,0
50	54,2	12,6	8,4	108,4
70	73,3	9,7	4,8	104,8
25-(OH)D2				
10	10,5	19,5	4,6	104,6
50	50,5	2,1	1,0	101,0
70	72,5	2,0	3,6	103,6

Πίνακας 12. Ορθότητα και ακρίβεια μεθόδου

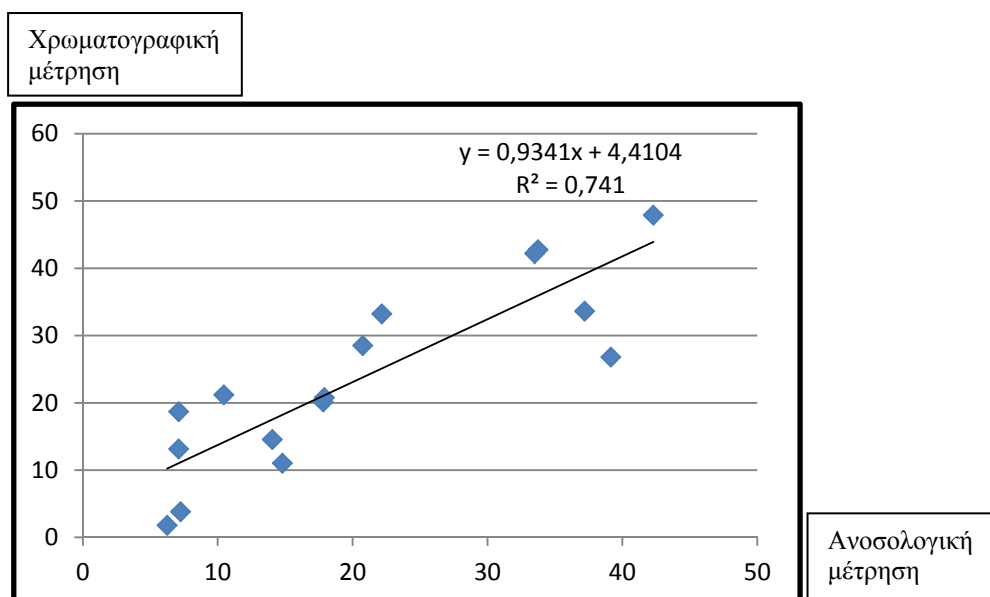
4.4 Επιδοκιμασία της μεθόδου που αναπτύχθηκε.

Σε μια μικρή μελέτη μετρήθηκαν 12 δείγματα ανθρώπινου πλάσματος με την μέθοδο που αναπτύχθηκε, τα οποία προηγουμένως αναλύθηκαν με προορισμό μέσω ανταγωνιστικής πρωτεινόςυνδεσης (CPBA) Elecsys Vitamin D total (Reche, USA). Οι μετρήσεις από τις δύο διαφορετικές τεχνικές μέτρησης συσχετίστηκαν. Ενώ η μέση διαφορά δεν είναι κλινικά σημαντική, η τυπική απόκλιση καταδεικνύει ότι για κάποια δείγματα οι δύο μέθοδοι μπορούν να δώσουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Και συγκεκριμένα δείγματα μπορούν να διαγνωστούν με ανεπάρκεια με την μία μέθοδο και με επάρκεια με την άλλη. Στην μελέτη που διεξήχθη υπήρξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα για δύο δείγματα τα οποία με την CPBA μέθοδο βρέθηκαν ανεπαρκή και με την HPLC μέθοδο βρέθηκαν επαρκή.

Ανοσολογική Μέτρηση ng/ml	Χρωματογραφική Μέτρηση ng/ml
7,11	18,70
10,45	21,20
17,82	20,14
22,16	33,23
33,75	42,77
7,1	13,15

14,05	14,55
20,75	28,51
37,2	33,63
6,25	1,80
7,25	3,82
39,15	26,80
33,5	42,22
17,9	20,78
42,3	47,90
14,8	11,05

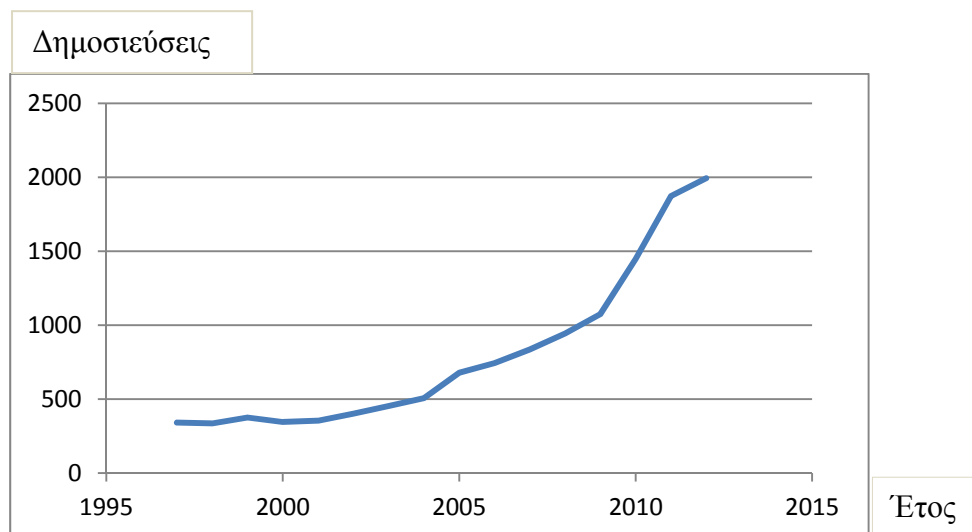
Πίνακας 13. Αντιστοίχιση ανοσολογικών και χρωματογραφικών μετρήσεων.



Γράφημα 5. Συσχέτιση των μετρήσεων που προκύψανε από τη μέτρηση των ίδιων δειγμάτων από τη χρωματογραφική μέθοδο που αναπτύχθηκε με μία εμπορική ανοσολογική τεχνική.

5 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο επιστημονικό και κλινικό ενδιαφέρον για το ρόλο της βιταμίνης D στην υγεία του ανθρώπου και αυτή η έκρηξη ενδιαφέροντος οφείλεται σε δύο κύριους λόγους (Γράφημα 6).



Γράφημα 6. Εκθετική αύξηση δημοσιεύσεων για τη βιταμίνη D στα έγκυρα επιστημονικά περιοδικά με κριτές την τελευταία δεκαετία (Scopus, 10-11-2013, αναζήτηση μόνο άρθρων με λέξεις «vitamin D» στον τίτλο)

Ο πρώτος λόγος είναι ότι από πολλές μελέτες όπως αναφέρθηκε, εμφανίζεται μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού με ανεπάρκεια, ακόμα και με έλλειψη σε βιταμίνη D. Η αιτία των χαμηλών επιπέδων της βιταμίνης D δεν έχει ως βάση παθολογικά αίτια, παρά το σύγχρονο τρόπο ζωής. Η λιγοστή έκθεση στον ήλιο, λόγω των συνηθειών του σύγχρονου ανθρώπου, καθώς και υπερβολική χρήση των αντηλιακών σκευασμάτων έχουν καταστήσει την έλλειψη σε βιταμίνη D σε πανδημία. Ο δεύτερος λόγος αφορά την ανακάλυψη νέων δράσεων της βιταμίνης D, πέρα από την κύρια δράση της. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της παραμένει δύσκολος και υπάρχει ανάγκη από έγκυρες τεχνικές μέτρησης με υψηλή εξειδίκευση και ακρίβεια. Αφενός, για ερευνητικούς σκοπούς, έτσι ώστε η επιστημονική κοινότητα να διεξάγει αξιόπιστες μελέτες και αφετέρου για κλινικό σκοπό, όπου πραγματοποιείται αξιολόγηση

επάρκειας σε βιταμίνη D ενός ασθενούς. Η μέθοδος HPLC με μεγάλο όγκο έγχυσης και εν σειρά εκχύλιση στερεάς φάσης αναπτύχθηκε, αυτοματοποιώντας και απλοποιώντας σημαντικά την ποσοτικοποίηση της 25-OH D3 και D2 στο πλάσμα. Με αυτή τη καινούργια μέθοδο αποφεύγονται χρονοβόρα βήματα προετοιμασίας του δείγματος εκτός της γραμμής, τα οποία συχνά αποτελούν πηγή “φθοράς” του δείγματος και ανθρώπινων σφαλμάτων. Όλα αυτά τα βήματα, όπως η εκτός της γραμμής εκχύλιση στερεάς φάσης, η εξάτμιση του δείγματος και η ανασύσταση του ξηρού καταλοίπου, έχουν ως στόχο τον καθαρισμό του δείγματος, την προσυγκέντρωση και τελικά την απομόνωση των αναλυτών. Η μέθοδος εμφανίζει πολύ καλή γραμμικότητα, χαμηλό όριο ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, υψηλή εξειδίκευση, επίσης είναι ακριβής και επαναλήψιμη.

6 Βιβλιογραφία

1. Wolf, G., 2004. The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus. *American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.*, 12 January, pp. 1299-1302.
2. McCollum, E.V., 1957. A history of Nutrition. Houghton Mifflin Co., Boston, MA.
3. Mellanby, E., 1919. An experimental investigation on rickets. *Lancet* 196: 407–412.
4. McCollum, E. V., Simmonds, N., Becker, J. E. & Shipley, P. G., 1922. Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J. Biol. Chem.* 53:293–312.
5. Hess, A. F. & Unger, L. J., 1921. The cure of infantile rickets by artificial light and by sunlight. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 18: 298.
6. Huldshinsky, K., 1919. Heilung von Rachitis durch ku"nstliche Ho"nsonne. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 45: 712–713.
7. Hess, A. F., Weinstock, M. & Heelman, F. D., 1925. The antirachitic value of irradiated phytosterol and cholesterol. *J. Biol. Chem.* 63: 305–309.
8. Heilbron, I. M., Kamm, E. D. & Morton, R. A., 1927. The absorption spectrum of cholesterol and its biological significance with reference to vitamin D. Part I. *Biochem. J.* 21: 78–85.
9. Windaus, A. & Hess, A., 1926. Sterine und antirachitisches Vitamin. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Go"ttingen*, pp. 175–184.
10. Rosenheim, O. & Webster, T. A., 1926. Further observations on the photochemical formation of vitamin D. *J. Soc. Chem. Ind.* 45: 932.
11. Windaus, A. & Hess, A., 1926. Sterine und antirachitisches Vitamin. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Go"ttingen*, pp. 175–184.
12. Askew, F. A., Bruce, H. M., Callow, R. K. Philpot, J. S. & Webster, T. A., 1931. Crystalline vitamin D. *Nature (Lond.)* 128: 758.
13. Reerink, E. H. & Van Wijk, W., 1931. The vitamin D problem. *Biochem. J.* 25: 1001–1009.

14. Windaus, A., 1931. The chemistry of irradiated ergosterol. *Proc. R.Soc. (Lond.)* 108: 568–575.
15. Windaus, A. & Bock, F., 1937. U"ber das provitamin aus dem Sterin der Schweineschwarte. *Z. Physiol. Chem.* 245: 168–170.
16. Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 684-700.
- Takeyama, K. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* **277**, 1827–1830 (1997).
17. Brenza, H. L. & DeLuca, H. F. Regulation of 25- hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 143–152 (2000).
18. Haussler, M. R., Haussler, C. A., Bartik, L., Whitfield, G. K., Hsieh, J. -, Slater, S., Jurutka, P. W. (2008). Vitamin D receptor: Molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition Reviews*, 66(SUPPL.2), S98-S112.
19. Verboven C, Rabijs A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C (February 2002). "A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein". *Nat. Struct. Biol.* 9 (2): 131–6.
20. Michael F Holick, Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, *Am J Clin Nutr* 2004;80(suppl):1678S– 88S (2004)
21. Christodoulou S., Goula T., Ververidis A., and Drosos G., Vitamin D and Bone Disease, *BioMed Research International* Volume 2013 (2013), Article ID 396541
22. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 2004;113:561–568.
23. Carlberg, C. *et al.* Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* **361**, 657–660 (1993).
24. Morelli, S., Buitrago, C., Boland, R. & de Boland, A. R. The stimulation of MAP kinase by 1 α , 25(OH)(2)-vitamin D(3) in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol. Cell Endocrinol.* **173**, 41–52 (2001).

25. Liu, M., Lee, M. H., Cohen, M., Bommakanti, M. & Freedman, L. P. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* **10**, 142–153 (1996).
26. Ylikomi, T. *et al.* Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam. Horm.* **64**, 357–406 (2002).
27. Lin, R. *et al.* Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1243–1256 (2002).
28. Bao, B. Y., Yao, J. & Lee, Y. F. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis* **27**, 1883–1893 (2006).
29. Ma³gorzata Wrzosek, Jacek Łukaszkiwicz, Micha³ Wrzosek, Andrzej Jakubczyk, Halina Matsumoto, Pawe³ Piłtkiewicz, Maria Radziwoń-Zaleska, Marcin Wojnar, Grażyna Nowicka, Vitamin D and the central nervous system, Pharmacological Reports, Review, (2013), 65, 271278
30. Brewer, L.D. *et al.* (2001) Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type Ca²⁺ channel expression in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **21**, 98–108
31. Garcion, E. *et al.* (1997) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Mol. Brain Res.* **45**, 255–267
32. Furman, I. *et al.* (1996) Differential expression of M-CSF, LIF, and TNF-genes in normal and malignant rat glial cells: regulation by lipopolysaccharide and vitamin D. *J. Neurosci. Res.* **46**, 360–366
33. Shinpo, K. *et al.* (2000) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. *J. Neurosci. Res.* **62**, 374–382
34. Heidi Wolden-Kirk a,b, Lut Overbergh a,†, Henrik Thybo Christesen b, Klaus Brusgaard c, Chantal Mathieu a, Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function, *Molecular and Cellular Endocrinology* **347** (2011) 106–120, 2011
35. Bhalla AK, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol.* 1984; **133**(4):1748–54. [PubMed: 6206136]

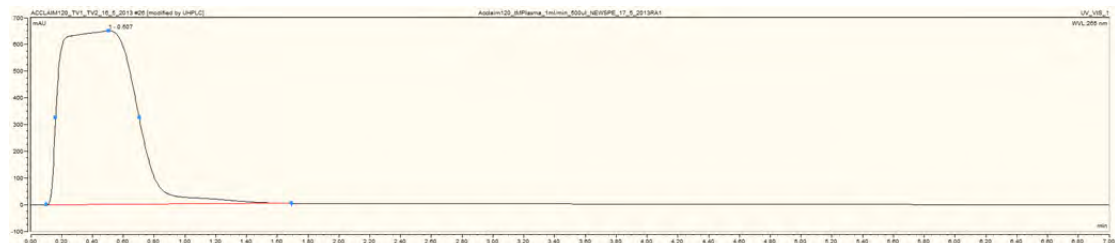
36. Mattner F, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol.* 2000; 30(2):498–508. [PubMed: 10671205]
37. Tang J, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol.* 2009; 182(8):4624–32. [PubMed: 19342637]
38. Gregori S, et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol.* 2001; 167(4):1945–53. [PubMed: 11489974]
39. Piemonti L, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocytederived dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 164(9):4443–51. [PubMed: 10779743]
40. Munger KL, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006; 296(23):2832–8. [PubMed: 17179460]
41. Merlino LA, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(1):72–7. [PubMed: 14730601]
42. Geneviere Mailhot., Vitamin D bioavailability in cystic fibrosis: a cause for concern?, *Nutrition Reviews®* Vol. 70(5):280–293
43. Krishna G Seshadria, b, Bubblu Tamilselvana, Amarabalan Rajendrana., Role of Vitamin D in Diabetes, *J Endocrinol Metab* • 2011;1(2):47-56
44. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW (1995) Structure–function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16:200–257
45. Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Coates PS, Horowitz M, Nordin BE (2008) Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res* 23:1859–1863)
46. William D. Fraser • Anna M. Milan, Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments William D. Fraser • Anna M. Milan *Calcif Tissue Int* (2013) 92:118–127
47. A.M. Wallace, S. Gibson, A. de la Hunty, C. Lamberg-Allardt, M. Ashwell Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations *Steroids* 75 (2010) 477–488)

48. Von Domarus C, Brown J., Barrencik F, Ainling M, Pogoda P., How much Vitamin D., Do We Need for Skeletal Health?, Clin. Orthop. Relat.Res., 2011 Mar 30.
49. Crutchley RD, Gathe JC, Mayberry C, Trieu A, Abughosh S, Garey K., Risk Factors for Vitamin D Deficiency in HIV-Infected Patients in the South Central United States., AIDS Res Hum Retroviruses., 2011 Aug 31.)
50. John J. Cannel and Bruce W. Hollis Use of Vitamin D in Clinical Practice, Alternative Medicine Review, Volume 13, Number 1, March 2008
51. Department of Health. Nutrition and bone health: with particular reference to calcium and vitamin D. Report on Health and Social Subjects, vol. 49. London, United Kingdom: The Stationery Office; 1998
52. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. Am J Clin Nutr 2006;84:18–28.
53. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol 2009;19:73–8.)
54. Graham D. Carter 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte Clinical Chemistry 58:3 486–488 (2012)
55. Bruce W. Hollis, Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25 Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment, Endocrinol Metab Clin N Am 39, (2010), 271–286
56. William D. Fraser , Anna M. Milan, Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments, Calcif Tissue Int (2013) 92:118–127
57. Gary L. Lensmeyer,^{1*} Donald A. Wiebe,^{1,2} Neil Binkley,³ and Marc K. Drezner^{3,4}, HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays Clinical Chemistry,(2006), 52:6 1120–1126
58. A.M. Wallace, , S. Gibson, A. de la Hunty, C. Lamberg-Allardt, M. Ashwell, Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations, Steroids 75, (2010), 477–488.
59. European Medical Agency (Science Medicines Health),(2011), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)
60. Harshad V. Paithankar, HPLC Method Validation For Pharmaceuticals: A Review, ,(2013), International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences 2(4)
61. Frank T. Peters Hans H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review, Accred Qual Assur ,(2002), 7:441–449

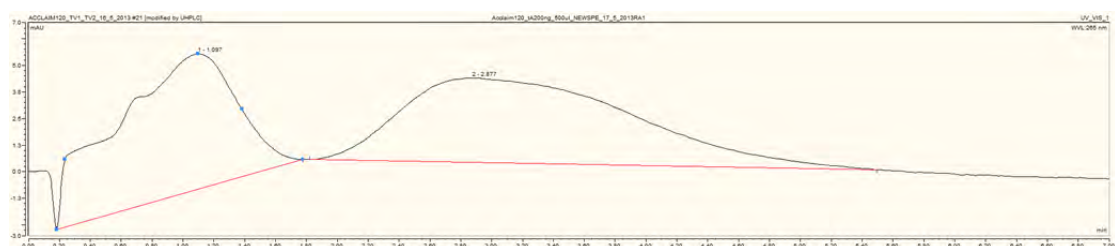
62. B. K. Matuszewski , M. L. Constanzer , C. M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.*, (2003), 75 (13), pp 3019–3030

Παράρτημα

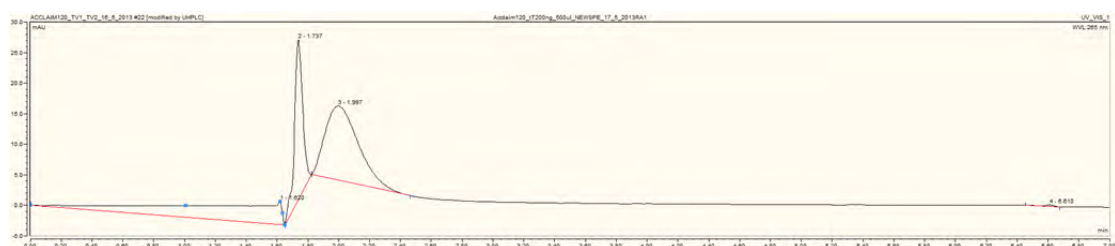
2.4.2



Χρωματογράφημα 1. t(M)

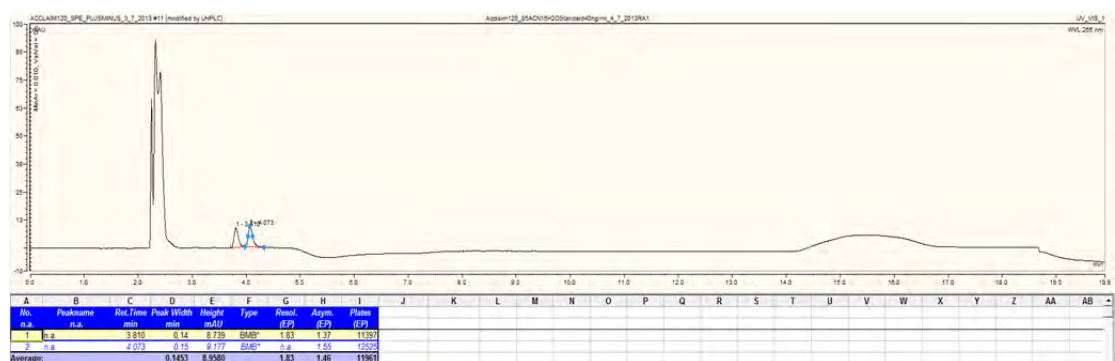


Χρωματογράφημα 2. t(A)

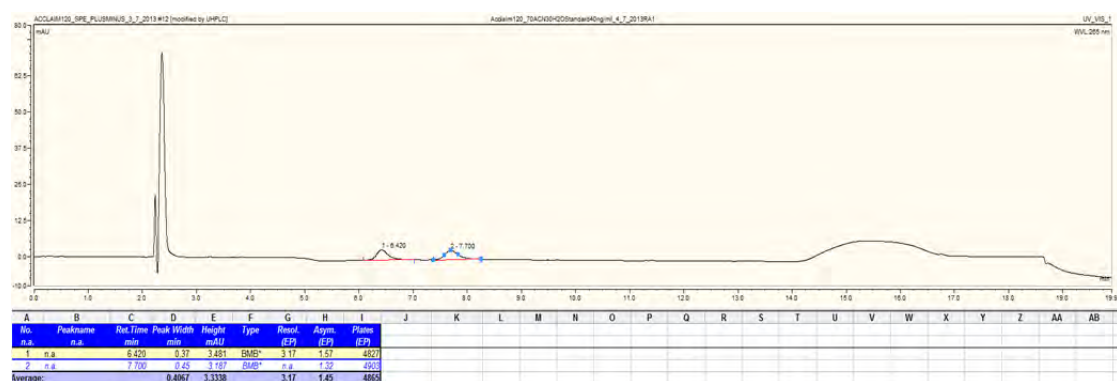


Χρωματογράφημα 3. t(T)

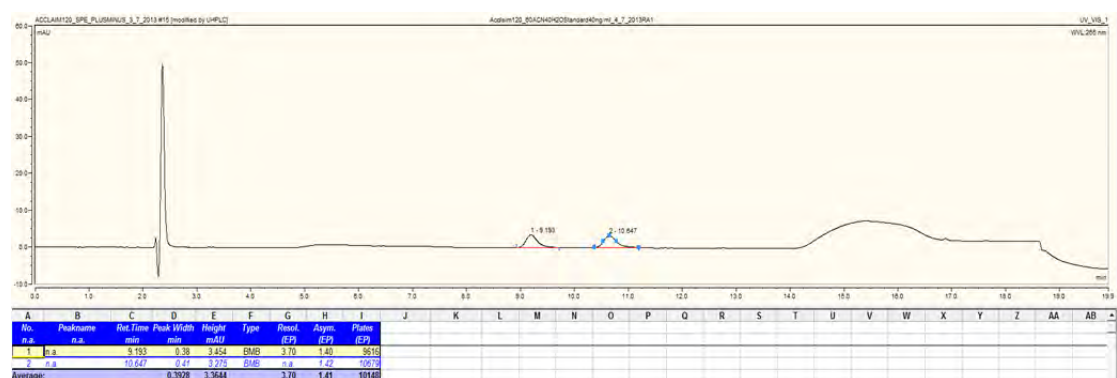
3.1



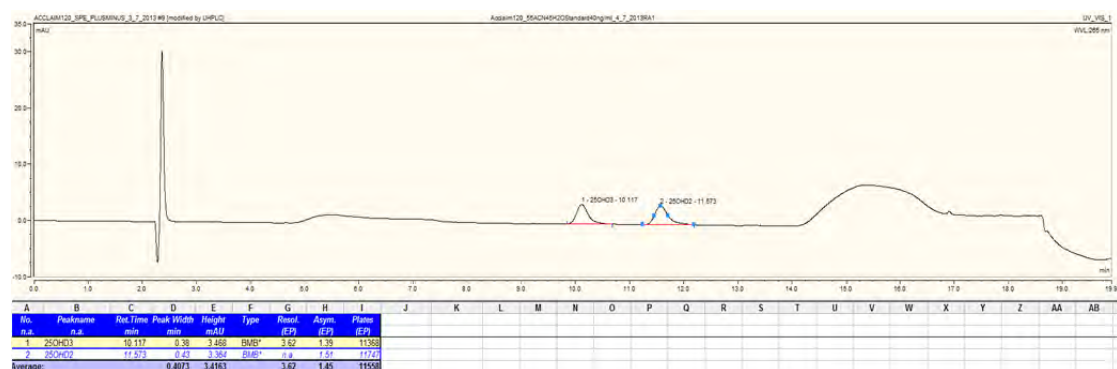
85ACN_15H2O



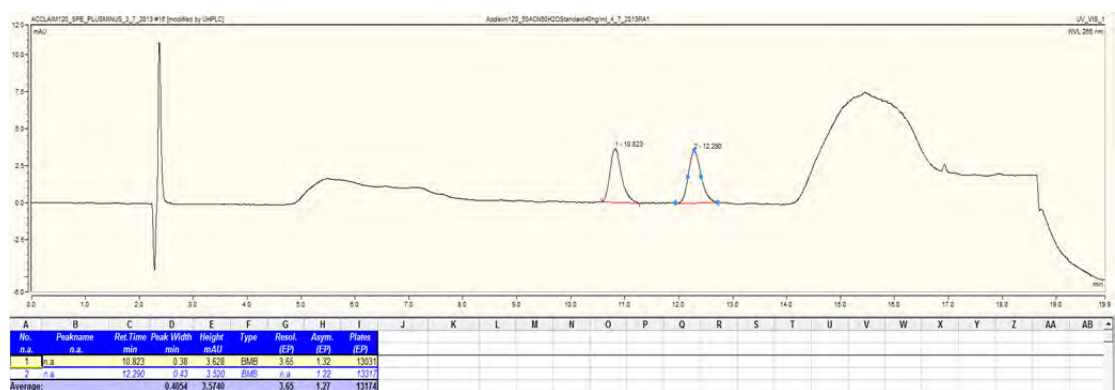
70ACN_30H2O



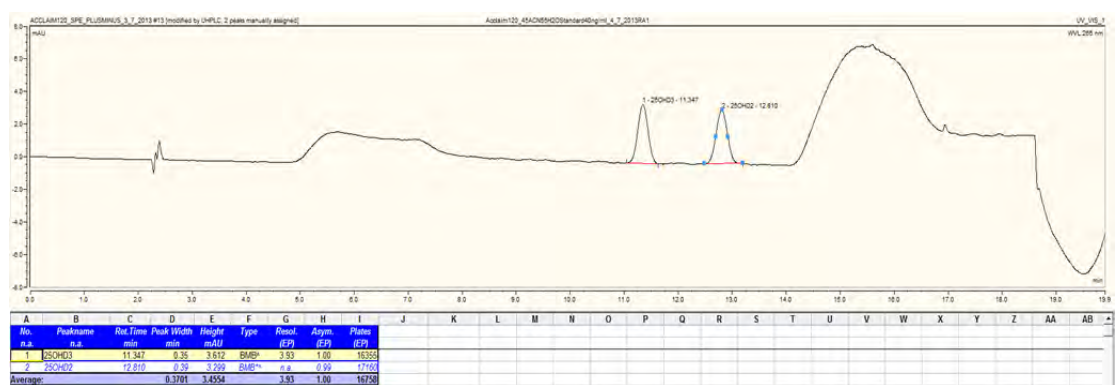
60ACN_40H2O



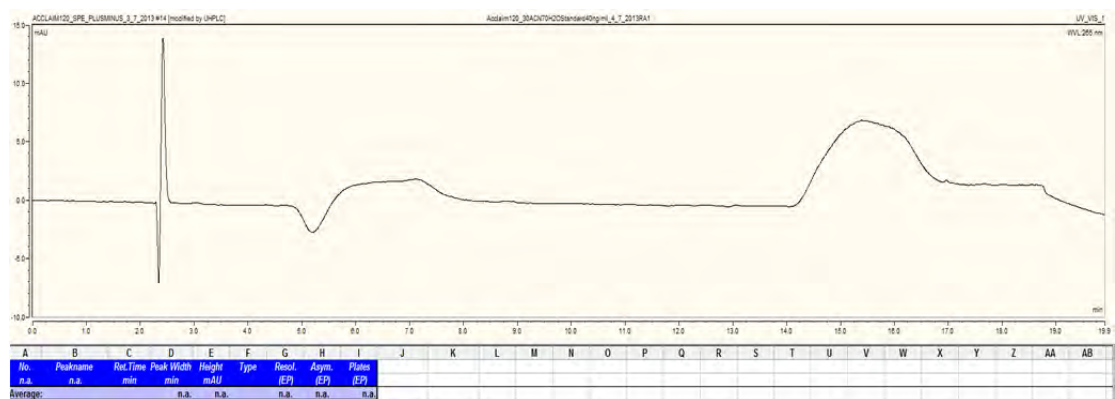
55ACN_45H2O



50ACN_50H2O

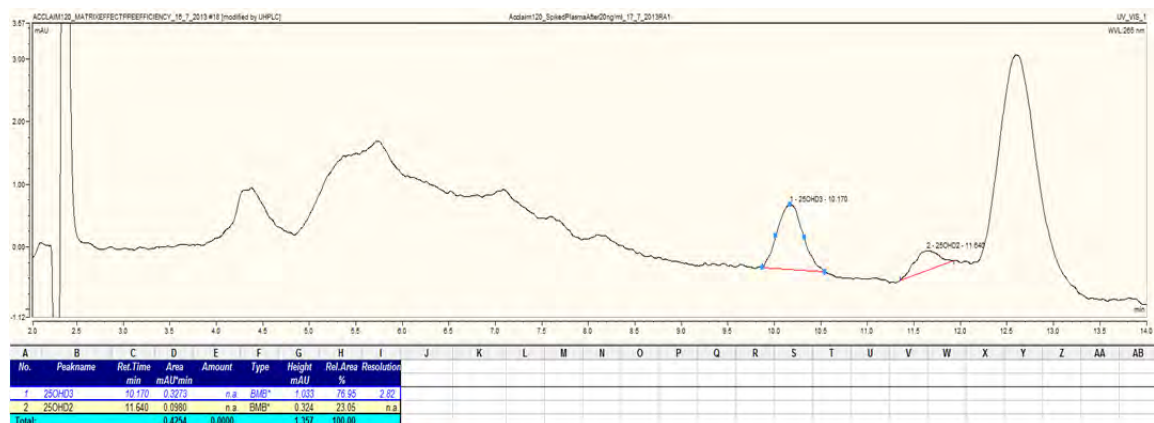


45ACN_55H2O

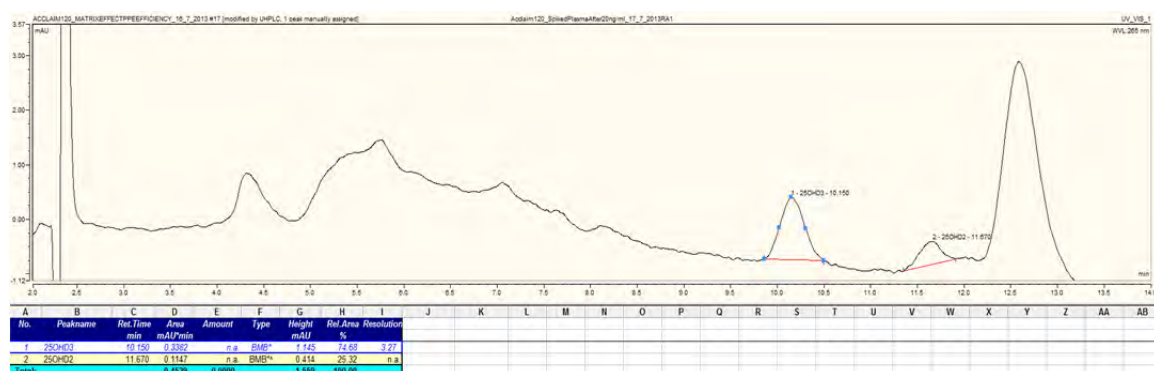


30ACN_70H2O

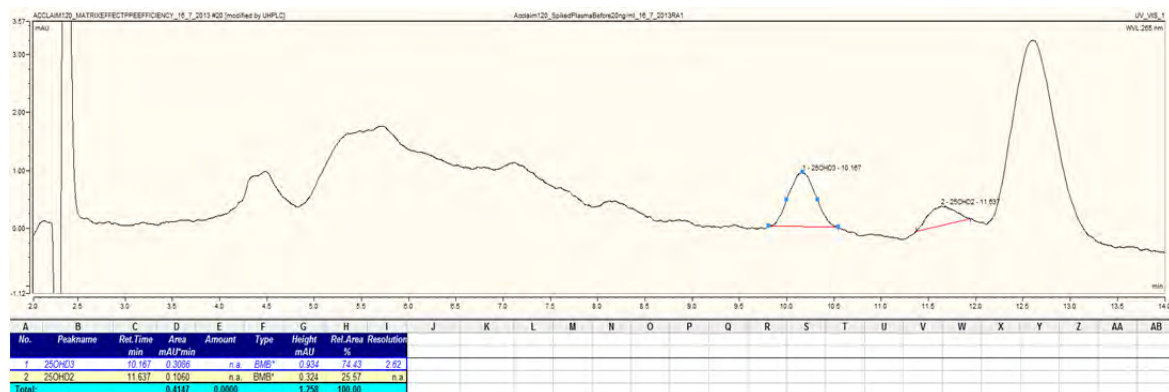
3.4



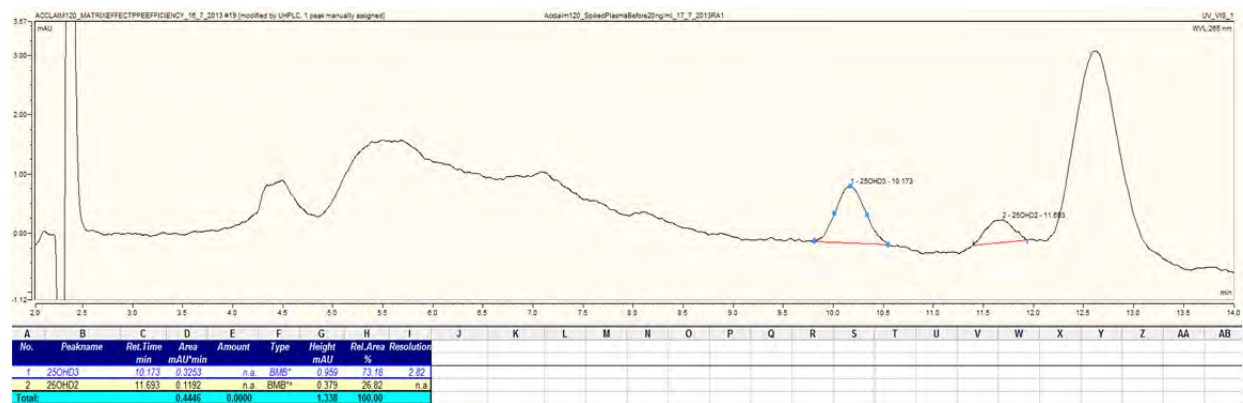
Δείγμα 1).εμβολιασμός πλάσματος μετά την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών 20ng/ml



Δείγμα 2).εμβολιασμός πλάσματος μετά την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών 20ng/ml

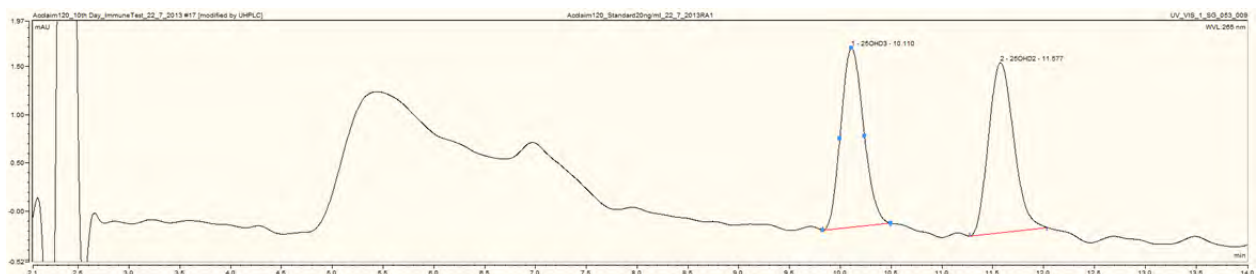


Δείγμα 1).εμβολιασμός πλάσματος πριν την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών 20ng/ml

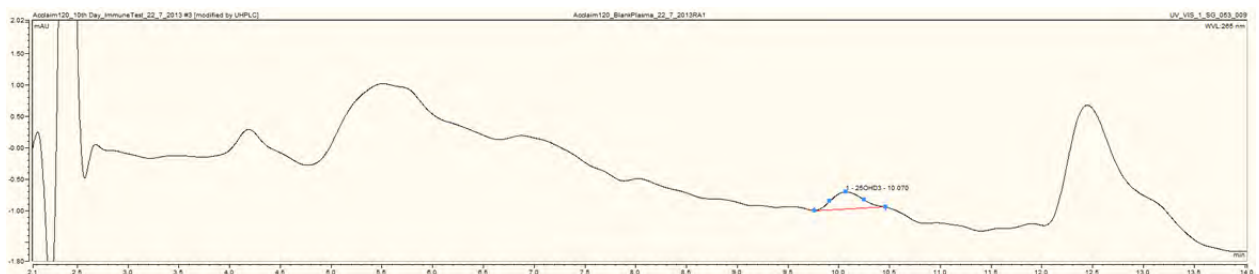


Δείγμα 2).εμβολιασμός πλάσματος πριν την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών 20ng/ml

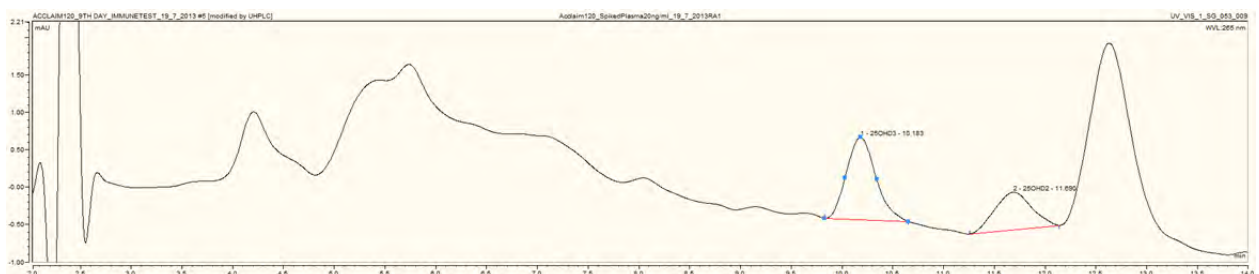
4.3



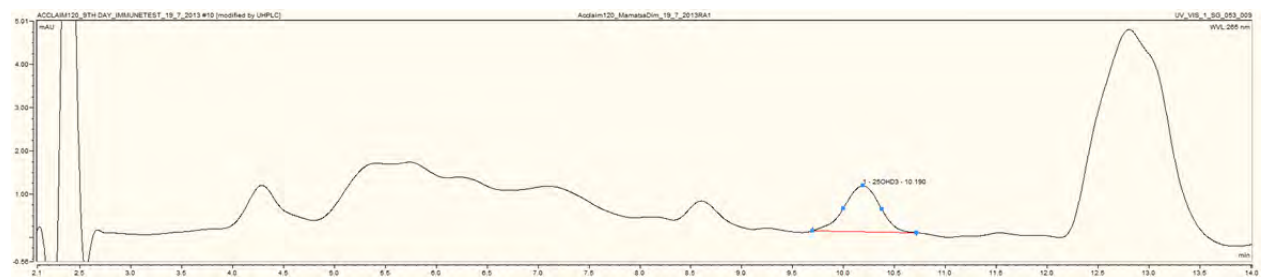
Πρότυπο διάλυμα 20ng/ml



Συνενωμένο πλάσμα



Εμβολιασμένο πλάσμα 20ng/ml



Πλάσμα ασθενή